

⑤

Int. Cl.:

A 61 k, 21/00

B5

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



⑤

Deutsche Kl.: 30 h, 6

⑩

Offenlegungsschrift 2 048 375

⑪

⑫

Aktenzeichen: P 20 48 375.4

⑬

Anmeldetag: 1. Oktober 1970

⑭

Offenlegungstag: 22. April 1971

Ausstellungspriorität: —

⑮

Unionspriorität

⑯

Datum: 2. Oktober 1969 11. September 1970

⑰

Land: V. St. v. Amerika

⑱

Aktenzeichen: 863351 71247

⑲

Bezeichnung: Wirksammachung von Antibiotika

⑳

Zusatz zu: —

㉑

Ausscheidung aus: —

㉒

Anmelder: Merck & Co. Inc., Rahway, N. J. (V. St. A.)

Vertreter: Abitz, W., Dr.-Ing.; Morf, D. F., Dr.;
Brauns, H.-A., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Patentanwälte,
8000 München

㉓

Als Erfinder benannt: Kahan, Frederick Marvin; Cassidy, Patrick Joseph;
Rahway, N. J. (V. St. A.)

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

DT 2048375

2048375

Patentanwälte
Dr. Ing. Walter Abitz
Dr. Dieter F. Morf
Dr. Hans-A. Drauns
8 München 86, Plenzenerstr. 28

1. Oktober 1970
14127

MERCK & CO., INC.,
Rahway, New Jersey, V. St.A.

Wirksammachung von Antibiotika

Die Aktivität von Antibiotika wird durch Verbindungen wirksam gemacht, welche die Biosynthese des Transportmechanismus stimulieren, der den Eintritt des Antibiotikums in die Zelle vermittelt. Verfahren zur Auffindung derartiger Verbindungen und zu ihrer Verwendung zur Wirksammachung der antibiotischen Aktivität sind vorgesehen. So werden Phosphonomycin, dessen Analoge und Derivate durch Verbindungen wirksam gemacht, die das α -Glycerinphosphat- oder das Hexose-6-phosphat-Transportsystem von Bakterien direkt oder nach dem Stoffwechsel auslösen können.

Die Beseitigung bakterieller Infektionen durch die Antibiotikatherapie wird häufig durch praktische Schwierigkeiten hinsichtlich der Erzielung ausreichend hoher Werte des Antibiotikums an der Stelle der Infektion durchkreuzt. In den Fällen, da lediglich am Rande wirksame Konzentrationen angewendet werden, ergeben sich häufig gegen Antibiotika

beständige Organismen aus dem ursprünglichen, infizierenden Bestand. Dieses Problem ist im Fall des neuen Antibiotikums Phosphonomycin- $\left[(-)-(cis-1,2-Epoxypropyl)-phosphonsäure\right]$ wesentlich, da es rasch ausgeschieden wird und seiner Wirkung durch übliche Bestandteile des Plasmas und Urins, z. B. Glucose bzw. Phosphat, entgegengewirkt wird. Ferner wurde festgestellt, dass das Antibiotikum gelegentlich gegenüber den vorher vorliegenden Mutanten, die gegenüber diesem Antibiotikum relativ beständig sind und in vielen bakteriellen Beständen auftreten, unwirksam ist. Demzufolge wurde nach Verfahren zur Beseitigung dieser Schwierigkeiten bei der antibiotischen Therapie gesucht.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht in einem Verfahren zur Steigerung der Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika, um eine Therapie bei Gewebswerten zu ermöglichen, die bei angemessener Dosierung erträglich sind. Eine andere Aufgabe besteht darin, das Auftreten von resistenten Bakterienorganismen während der antibiotischen Therapie zu verhindern. Ferner liefert die Erfindung ein Verfahren zur Erteilung von Empfindlichkeit an Bakterienbestände, die sonst entweder durch frühere Erlangung von Beständigkeit gegenüber dem Antibiotikum oder durch innere Unempfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum nicht zu behandeln sind. Eine weitere Aufgabe besteht in einem Verfahren, unter Anwendung geeigneter Auslöser zur Hervorbringung neuer Wege und/oder zur Steigerung der Wirksamkeit bereits vorliegender Wege zur Aufnahme von Antibiotika durch Verwendung geeigneter Auslöser oder Induziermittel. Ferner sollen nach dem erfindungsgemässen Verfahren Verbindungen ermittelt werden, die als Induziermittel wirken, welche bisher unerwartete Wege zur Aufnahme von Antibiotika durch Bakterien erschliessen. Ferner besteht eine Aufgabe in einem Verfahren zur Steigerung des α -Glycerinphosphat-Transportwegs, der für die Aufnahme von

Antibiotika verantwortlich ist und zur Erschliessung des Glucose-6-phosphat-Transportweges. Weitere Aufgaben ergeben sich aus der nachfolgenden Erfindungsbeschreibung.

Gemäss der Erfindung wurde gefunden, dass die Aktivität von Antibiotika in hohem Masse durch Verbindungen wirksam gemacht werden kann, die dahingehend wirken, dass ein bestehender Weg gefördert wird oder neue Transportwege bei Bakterien erschlossen werden. Verbindungen, welche die Aktivität des α -Glycerinphosphat-Transportsystems steigern oder de novo ein Hexose-phosphatsystem in Bakterien hervorrufen, können somit entweder vor der Behandlung mit einem Antibiotikum oder gleichzeitig mit einem Antibiotikum zur Wirksammachung dessen Aktivität verwendet werden. Beispielsweise werden Mikroorganismen, welche kein Zeichen von Empfindlichkeit gegenüber einem speziellen Antibiotikum ^{zeigen} entweder auf Grund der Abwesenheit eines Transportweges oder weil lediglich ein geringes Ausmass an geeigneten Transportwegen vorhanden ist, gegenüber dem Antibiotikum durch Aussetzung gegenüber Induziermitteln empfindlich gemacht werden, um einen geeigneten Weg herbeizuführen oder eine Steigerung des bestehenden Weges hervorzubringen. Mit dem hier verwendeten Ausdruck "Induziermittel" wird eine verwendete Verbindung bezeichnet, die entweder direkt oder nach Stoffwechsel durch Wirt oder Bakterium mit dem regulierenden Mechanismus der Zelle zusammenwirkt, der die Biosynthese spezifischer Transportwege regelt. In solchen Fällen, wo weniger als die maximalen Synthesegeschwindigkeiten des aufnahmefähigen Transportsystems vor Einführung des Induzierungsmittels in das Medium auftreten, wird letzteres als die Synthesegeschwindigkeit steigernd und somit die Aktivität je Zelle des Transportsystems erhöhend bezeichnet. In solchen Fällen, wo die Synthesegeschwindigkeit einer speziellen Klasse in Abwesen-

heit von Induzierungsmitteln praktisch Null ist, werden diese Verbindungen als das latente Potential der Zelle unter Erzeugung des Transportweges erschliessend bezeichnet. Das Induzierungsmittel muss nicht, ist jedoch häufig ein Substrat für eine der Gruppe von Proteinen, die es steigert oder erschliesst.

Gemäss einer speziellen Ausführungsform der Erfindung wurde gefunden, dass bestimmte Verbindungen als Induzierungsmittel mit Bakterien entweder vor oder gleichzeitig mit Phosphonomycin, dessen Analogen und Derivaten wirkt und dadurch die Aktivität dieser antibiotischen Substanzen wirksam macht. Diese Verbindungen, die als Induzierungsmittel wirken, erhöhen entweder die Wirksamkeit des α -Glycerinphosphat-Transportweges oder erschliessen einen neuen Transportweg, z. B. ein Hexose-phosphat-Transportsystem. Auf Grund der Wirksamkeit dieser Induzierungsmittel für diese Transportsysteme wurde gefunden, dass auf diese Weise angeregte Organismen höhere Werte an Phosphonomycin ansammeln und somit durch relativ geringe Dosierungen des Antibiotikums getötet werden. Organismen, die kein Zeichen von Empfindlichkeit gegenüber Phosphonomycin entweder auf Grund geringer Mengen an vorliegendem α -Glycerinphosphat-System oder dessen Abwesenheit in dem Organismus als Ergebnis einer Mutation zu Phosphonomycin Resistenz zeigen, werden gegenüber diesem Antibiotikum durch Erschliessung des zweiten Hexose-phosphat-Transportweges empfindlich gemacht. Ein anderer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass derartige Organismen, die zwei oder mehr unabhängige Transportsysteme besitzen, ein geringeres Auftreten an antibiotischer Resistenz zeigen, da der gleichzeitige Verlust durch Mutation zweier Wege bei Mikroorganismen selten ist. Es sind auch Verfahren zur Auffindung von Verbindungen vorgesehen, die als Induzierungsmittel für diese und andere Transportsysteme, welche Zugang zu Phosphonomycin-Antibiotika zu den Zellen

herbeiführen, wirken können. Ferner wird die Auslösung eines dritten Phosphonomycin-Transportweges durch Riboflavin-5-phosphat dargetan. Es sei betont, dass die hier beschriebenen Induziermittel keine Antibiotika oder Antimetabolite sind, sondern die Biosynthese natürlicher Nährstoff-Transportmechanismen stimulieren, welche den Eintritt in die Zelle des Phosphonomycin-Antibiotikums vermitteln. Dieses Phänomen gilt einzig für die Phosphonomycin-Antibiotika, da festgestellt wurde, dass auf diese Weise induzierte Bakterienstämme keine Steigerung hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber anderen getesteten Antibiotika zeigen. Eine wichtige, vorteilhafte Folgerung der Verwendung der als Induziermittel dienenden Verbindungen besteht darin, dass das Induziermittel nicht vorliegen muss, wenn die Transportsysteme den Eintritt des Antibiotikums in das Bakterium vermitteln. Somit können Induziermittel, welche dem Transport des Phosphonomycin-Antibiotikums, wenn sie gleichzeitig mit diesem Antibiotikum vorliegen, in Konkurrenz mit den Transportproteinen entgegenwirken können, gut vor der Verabreichung des Antibiotikums zugegeben werden, wobei Gelegenheit gegeben wird, sich in dem Wirt zu verteilen. Ferner erfordert das erfindungsgemäße Verfahren im Gegensatz zu der üblichen Synergie durch Verabreichung von zwei Antibiotika nicht, dass der Blutspiegel und die Ausscheidungsgeschwindigkeit von zwei oder mehr Bestandteilen aufeinander abgestimmt sind. Daher ist die bisher angetroffene Schwierigkeit von sich tatsächlich ergebenden wirksamen Werten von zwei verschiedenen synergistisch wirkenden Arzneimitteln auf Grund der vorliegenden Erfindung ausgeschaltet, da die verwendeten Induziermittel lediglich das Bakterium induzieren müssen und dann verschwinden; die erzeugten Transportproteine bleiben und liefern dadurch ein Eintrittsmittel des Antibiotikums in die Bakterienzelle.

Gemäss einer anderen Ausführungsform der Erfindung wurde nun gefunden, dass bestimmte mehrwertige Alkohole und deren Derivate als Induzierungsmittel entweder unter Steigerung der Aktivität des α -Glycerinphosphat-Transportsystems oder unter Auslösung eines Hexose-6-phosphat-Transportsystems wirken und daher mit Phosphonomycin-Antibiotika hinsichtlich der Bekämpfung derartiger Bakterien zusammenwirken. Somit wurde gefunden, dass Glycerin, ein Phosphatid und Zuckerphosphate als Induzierungsmittel geeignet sind. Zu erwähnende Zuckerphosphate, welche bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung darstellen, sind Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Glucose-1-phosphat, 2-Desoxy-glucose-6-phosphat, 2-Amino-2-desoxy-glucose-6-phosphat, Glucose-1,6-diphosphat, Galactose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat und dgl. Wenn also empfindliche Bakterien mit diesen Zuckerphosphaten entweder vor oder gleichzeitig mit einem Phosphonomycin-Antibiotikum in Berührung gebracht werden, machen diese Phosphate oder ein davon abgeleiteter Metabolit die Aktivität des Antibiotikums wirksam, und es ist dann möglich, geringere Mengen des Antibiotikums zu verwenden als sonst zur Bekämpfung des Pathogens notwendig wäre. Diese beobachtete Zusammenwirkung bei der Induzierung eines Hexose-6-phosphat-Transportsystems zur Wirksammachung der Wirksamkeit des Phosphonomycin-Antibiotikums ist tatsächlich bemerkenswert und völlig unerwartet. Beispielsweise wurde bei Versuchen mit Mäusen gegen E. coli gefunden, dass bei Verwendung einer Kombination von Glucose-6-phosphat und dem Antibiotikum die zum Schutz der Hälfte der Mäuse notwendige Dosis an Phosphonomycin-Antibiotikum weniger als ein Zehntel der Menge beträgt, die an Antibiotikum allein erforderlich ist.

Anstelle der Verwendung eines Zuckerphosphats ist es auch möglich, Induzierungsmittel in situ durch Injektion geeigneter

Enzyme oder Substrate in den Wirt zu erzeugen. Beispielsweise kann die Hexokinase mikrobieller Herkunft, aus Hefe, tierischem oder menschlichem Ursprung die in Gewebsflüssigkeiten angetroffene freie ATP und Glucose zur Erzeugung von Glucose-6-phosphat verwerten. Vorzugsweise wird menschliche Hexokinase, Glycerokinase oder Glucokinase verwendet, um mögliche Probleme der Antigenizität herabzusetzen. Es ist auch möglich, die gleichzeitige Injektion eines geeigneten, energiereichen Phosphatdonators, wie beispielsweise Adenosin-5'-triphosphat oder Phosphoenolpyruvat mit diesen Enzymen und die Einnahme oder Injektion geeigneter Zuckerakzeptoren, wie beispielsweise Fructose, Mannose, Glucosamin, die in ihrer phosphorylierten Form Induziermittel der Transportsysteme sind, zu verwenden. Es können auch Gruppen von Enzymen verabreicht werden, die schliesslich die aufgeführten Induziermittel, z. B. Glykogen-phosphorylase ergeben, die bei Einwirkung entweder auf vom Wirt herstammendem oder injiziertem Glykogen zunächst Glucose-1-phosphat erzeugen, das durch Einwirkung der endogenen oder zugefügten Phosphoglucomutase in Glucose-6-phosphat überführt wird. Die Brauchbarkeit irgendeiner Kombination von Enzymen und Substraten kann dadurch ermittelt werden (als eine praktische Alternative gegenüber dem direkten Test in infizierten Tieren oder Menschen), indem diese Substanzen tierischem oder menschlichem Plasma zugesetzt werden, bei Körpertemperatur während verschiedener Zeiträume inkubiert werden und dann das Inkubationsgemisch (nach Inaktivierung des Enzyms) hinsichtlich seiner Fähigkeit, phosphonomycinresistenten Mikroorganismen gegenüber Phosphonomycin empfindlich zu machen, zu testen. Ein derartiges, hochempfindliches Testsystem wird im folgenden beschrieben. Ein Alternativsystem zur Untersuchung von Enzymen oder Substraten oder Kombinationen von beiden, das hinsichtlich der Erzeugung von Induziermitteln des Phosphonomycin-Transportes in situ ^{Wirksamkeit} besteht in der Injizie-

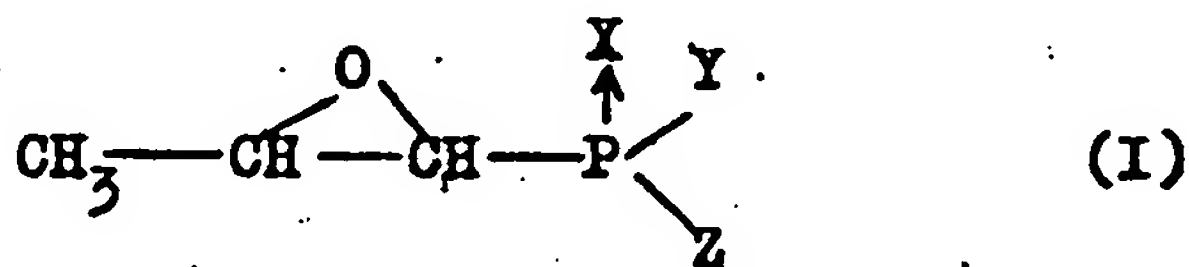
rung dieser Substanzen in gesunde Tiere oder Menschen und anschliessender Entnahme von Blutproben zur Prüfung der Wirksamkeit in dem im folgenden beschriebenen Testsystem. Bei der Untersuchung dieser Proben ist es wesentlich, zunächst die Blutzellen zu entfernen und das Plasma durch Hitze zu inaktivieren, um sämtliche Enzyme natürlichen oder injizierten Ursprungs zu beseitigen, die Induziermittel auf der Testplatte selbst anstelle in dem injizierten Wirt erzeugen. Verfahren und Systeme zur Bestimmung und Klassifizierung von Induziermitteln der beiden berücksichtigten Wege des Phosphonomycin-Eintritts in Bakterien (das α -Glycerinphosphat-Transportsystem und ein Hexose-6-phosphat-Transportsystem) werden im einzelnen aufgeführt. Diese Verfahren und Systeme können leicht zur Verwendung bei der Bestimmung weiterer, brauchbarer Induziermittel dieser und bisher nicht ermittelter Transportwege verallgemeinert werden mit irgendeinem Bakterienstamm, der mit Phosphonomycin, dessen Analogen und Derivaten behandelt werden soll. Diese allgemeine Methode besteht in der Isolierung eines phosphonomycinresistenten Mutantenstamms aus einem empfindlichen Beispiel des zu behandelnden Stamms und in der Feststellung, dass die Resistenz tatsächlich auf einem Versagen des Phosphonomycins beruht, das in adäquaten Mengen in die Zelle eindringen soll. Dieser Verlust an wildem Transport kann dadurch festgestellt werden, dass entweder der gleichzeitige Verlust der α -Glycerinphosphat-Stoffwechselkapazität des Mutantenstammes nachgewiesen wird oder ein verringertes Ausmass an Phosphonomycin selbst in diesen Mutanten nachgewiesen wird, wenn sie dem arzneimittelhaltigen Medium ausgesetzt werden. Diese Mutanten werden dann entweder in ein flüssiges oder festes Medium gebracht, das wesentlich höhere Phosphonomycinmengen enthält als ein Medium, in dem der Ausgangsstamm überleben würde, jedoch eine solche Menge aufweist, die noch ein Wachstum des Mutantenstammes erlaubt. Unter

diesen Bedingungen wird jedes beliebige Induktionsausmass zusätzlicher Eindringwege für Phosphonomycin als Inhibition des Bakteriumwachstums auf Grund der hohen Antibiotikumswerte, welche die Mutante umgeben, empfindlich ermittelt. Die Induktion kann entweder durch Einschluss des potentiellen Induziermittels zusammen mit Phosphonomycin in empfindliche Scheiben oder durch Verteilung des Induziermittels durch den Agar oder das flüssige Medium erreicht werden. In solchen Fällen, wo zu erwarten ist, dass das Induziermittel selbst mit dem Arzneimittel zur Verwendung des neuen Eintrittsverfahrens konkurriert (z. B. im Fall eines α -Glycerinphosphats selbst), kann man auch den Impfstoff aus Mutanten-organismen dem Induziermittel vor deren Kombination mit Phosphonomycin aussetzen, wobei dann das konkurrierende Induziermittel durch irgendeine Zelltrenntechnik (Filtration, Zentrifugierung und dgl.) ausgewaschen wird, und diese vorinduzierten Zellen mit Phosphonomycin in flüssigem Medium kombiniert werden können. Indem neue Verbindungen ermittelt worden sind, welche eine Wachstumsinhibition ergeben können, kann leicht nachgewiesen werden, ob die verwendete Verbindung selbst die Wachstumshemmung in Medien ergibt, welche kein zugesetztes Phosphonomycin enthalten.

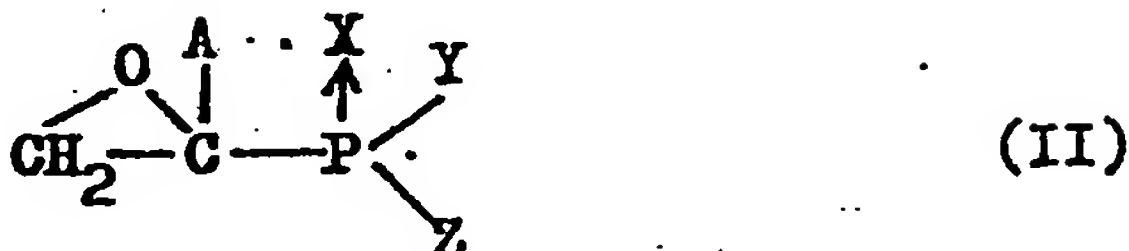
Das Zusammenwirken der hier beschriebenen Induziermittel mit dem Phosphonomycin-Antibiotikum liefert ein wertvolles Mittel zur Bekämpfung und Beseitigung von Bakterien, die sonst gegenüber der Einwirkung eines Phosphonomycin-Antibiotikums resistent sind. Es kann also eine Kombination des Induziermittels und des Antibiotikums in einem geeigneten Träger, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden kann, zur Behandlung von Infektionen topisch verwendet werden. Das Induziermittel und das Antibiotikum können auch parenteral oder oral an einen infizierten tierischen oder mensch-

lichen Wirt entweder getrennt oder in Kombination in einem geeigneten pharmazeutischen Träger verabreicht werden, oder eines kann parenteral und das zweite kann oral verabreicht werden. Diese pharmazeutischen Formen des Antibiotikums und/oder der induzierenden Verbindung können nach bekannten Verfahren unter Verwendung geeigneter pharmazeutischer fester oder flüssiger Verdünnungsmittel hergestellt werden. Die Massen können in Form von Tabletten, Pulvern, Granulaten, Kapseln, Suspensionen, Lösungen, Elixieren, Sirupen oder in anderen Dosierungsformen, die sich insbesondere für die orale Verabreichung eignen, vorliegen. Die Masse kann auch in Form sterilisierter Lösungen oder Suspensionen zur parenteralen Verabreichung vorliegen. In diesen Produkten kann der sterile Träger eine sterile Lösung oder Suspension sein. Die das Antibiotikum enthaltenden Zubereitungen können mit festen Verdünnungsmitteln und/oder Tablettierhilfsmitteln, z. B. Maisstärke, Talk, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Gummiarten und dgl., vermischt werden. Die üblichen Einkapselungs- oder Tablettiermaterialien, welche zur Herstellung pharmazeutischer Produkte geeignet sind, können verwendet werden, so lange sie nicht mit dem Antibiotikum oder den induzierenden Verbindungen unverträglich sind. Diese Dosierungsformen können 25 bis 500 mg der aktiven Substanz enthalten und können in Dosierungen verabreicht werden, die 1 bis 6 mal je Tag gegeben werden, je nach dem Alter und Zustand des Patienten, der Infektion und der Art der Verabreichung.

Der hier verwendete Ausdruck "Phosphonomycin-Antibiotikum" schliesst Phosphonomycin und dessen Derivate der Formel



und die entsprechenden Analogen der Formel



ein, worin A Wasserstoff oder einen niederen Alkylrest, X Sauerstoff oder Schwefel, Y und Z, die gleich oder verschieden sein können, die Reste

OH, OR, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{NR}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$, $-\text{NROR}$, $-\text{NRNR}_1\text{R}_2$, $-\text{NR}-\text{N}=\text{CR}_1\text{R}_2$,
 $-\text{NR}-\overset{\text{NR}}{\underset{\text{X}}{\text{C}}}-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{NHC}-\overset{\text{X}}{\text{XR}}$, $\text{NH}-\overset{\text{X}}{\underset{\text{X}}{\text{C}}}-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{N}=\text{C}=\text{X}$, oder $-\text{N}_3$ bedeuten,
 worin X Sauerstoff oder Schwefel, R ein Wasserstoffatom, eine Kohlenwasserstoffgruppe oder substituierte Kohlenwasserstoffgruppe und R_1 und R_2 Wasserstoff, einen Acyl- oder einen Kohlenwasserstoffrest oder substituierten Kohlenwasserstoffrest darstellen. In die Formeln I und II sind gleichfalls die anorganischen und organischen Salze solcher Verbindungen eingeschlossen, in denen Y und/oder Z eine OH-Gruppe darstellen, und die cyclischen Derivate, in denen Y und Z über einen Rest einer polyfunktionellen Kohlenwasserstoffverbindung verbunden sind, z. B. einen geradkettigen oder verzweigt-kettigen Alkylen-, Aralkylen- und Arylen-polyamin- und Aminoalkoholrest und dgl., z. B. Äthylen-diamin, Monoäthanolamin, Phenylendiamin, Naphthalindiamin, o-Aminophenol und dgl., und solche cyclische Derivate, in denen die Gruppierung $-\overset{\text{N}}{\text{N}}-\text{R}_1\text{R}_2$ den Rest eines cyclischen primären oder sekundären Amins bedeutet, z. B. Morpholin, Piperidin oder Pyrrolidin.

Wenn R, R_1 oder R_2 in den Formeln I und II einen Kohlenwasserstoffrest oder einen substituierten Kohlenwasserstoff-

rest darstellen, kann dieser Rest ein aliphatischer, cycloaliphatischer, araliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest sein, der gegebenenfalls weiter substituiert sein kann. Somit kann er beispielsweise ein aliphatischer Rest sein, z. B. ein substituierter oder unsubstituierter Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylrest. Beispiele für R , R_1 und R_2 , die einen araliphatischen Rest darstellen, sind solche Fälle, in denen der Rest ein Aralkyl- oder substituierter Aralkylrest ist, beispielsweise Benzyl-, Phenäthyl-, Phenylpropyl-, p-Halogenbenzyl- und o-, m- oder p-Alkoxybenzyl-, Nitrobenzyl-, Aminophenäthyl-, Pyridyläthyl-, Nitrofurylmethyl-, Thienylpropylrest und dgl.

R , R_1 und R_2 stellen auch einen Arylrest oder substituierten Arylrest dar, z. B. Phenyl-, Naphthyl- oder substituierten Phenylrest.

Gemäss den vorstehenden Ausführungen kann also die Amidgruppe oder können die Amidgruppen von Verbindungen hergeleitet werden, die selbst antibakteriell sind. Als Beispiele für derartige Verbindungen können 6-Aminopenicillansäure, 7-Aminocephalosporansäure, Sulfa-Verbindungen, wie beispielsweise Sulfanilamid, Sulfadiazin, Sulfamerizin, Sulfamethazin, Sulfadimetin, Sulfapyridin, Sulfathiazol, Sulfisoxazol, Thiodiazol, Sulfacetamid, Sulfaguanidin, Sulfachinoxalin, und p-Aminophenylsulfonamid und p-Aminobenzonsulfonsäure, antibiotische Mittel, wie beispielsweise Ampicillin, Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Cycloserin, Cephaloglycin, Cephalixin und dgl., genannt werden.

Solche Verbindungen der Formeln I und II, die sauer sind, d. h. die freien Säuren, können Salze bilden, und diese Salze stellen eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung

dar, da sie stabiler sind als die freie Säure. Wie sich dem Fachmann ergibt, bilden die Verbindungen der Formeln I und II, wo wenigstens einer der Reste Y und Z eine OH-Gruppe bedeutet, organische und anorganische Salze, und beide werden von der Erfindung in Betracht gezogen. Beispiele für diese Salze sind anorganische Metallsalze, z. B. die Natrium-, Aluminium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Silber- und Eisensalze. Zu organischen Salzen, die als Beispiele erwähnt werden können, gehören die Salze mit primären, sekundären oder tertiären Aminen, beispielsweise Monoalkylamine, Dialkylamine, Trialkylamine und stickstoffhaltige heterocyclische Amine. Typische Beispiele sind Salze mit Aminen, z. B. α -Phenäthylamin, Diäthylamin, Chinin, Brucin, Lysin, Protamin, Arginin, Procain, Äthanolamin, Morphin, Benzylamin, Äthylendiamin, N,N'-Dibenzyläthylendiamin, Diäthanolamin, Piperazin, Dimethylaminoäthanol, 2-Amino-2-methyl-1-propanol, Theophyllin, Ester der Aminosäuren und N-Methylglucamin. Gegebenenfalls kann der basische Anteil des Salzes ein biologisch-aktives Amin, z. B. Erythromycin, Oleandomycin oder Novobiocin, sein.

Die Monoamid-monoester-Derivate und insbesondere solche Verbindungen, die einen labilen Estersubstituenten aufweisen, sind besonders wertvolle Derivate. Mit dem hier verwendeten Ausdruck "labiler Ester" wird eine Gruppe umfasst, die leicht biologisch-hydrolysiert werden kann, z. B. durch Enzyme in den Körperflüssigkeiten von Lebewesen einschliesslich Menschen, um die freie Säure oder ein Salz davon zu erzeugen, das wirksamer als ein antibiotisches Mittel ist. Die Amidgruppe oder substituierte Amidgruppe, die in den Amidester-Derivaten vorliegen, können auch leicht in den Körperflüssigkeiten biologisch hydrolysiert werden, und daher sind die Amid-labilen Ester-Derivate bei der Antibiotikatherapie geeignet.

Die Ester, die zur Verwendung als antibiotische Mittel ausreichend labil sind, werden in einfacher Weise experimentell ermittelt, z. B. durch Inkubation mit Körperflüssigkeiten, um festzustellen, ob unter diesen Bedingungen die Estergruppe abgespalten wird oder nicht. Es können auch andere Methoden, einschliesslich chemischer Tests, verwendet werden, um festzustellen, ob spezielle Estergruppen ausreichend labil sind. Die Ester, die nachweisbare antibiotische Aktivität nach Erhitzen in einem wässrigen Medium während 2 Stunden bei 37°C und einem pH-Wert von 2,2 oder in einem wässrigen Medium während 80 Stunden bei pH 9 ergeben, können als labile Ester angesehen werden. Zu erwähnende geeignete labile Estergruppen sind Äther der Formel $-\text{CH}_2\text{OR}$, eine Phenacyloxymethylgruppe, Acyloxymethylgruppe der Formel $-\text{CH}_2\text{OA}$, worin A eine Acylgruppe darstellt, die einen von einer organischen Säure durch Entfernung der Hydroxygruppe hergeleiteten organischen Rest aufweist, Amid- und substituierte Amid-Derivate dieser Acyloxymethyl-Substituenten, Acylaminomethylgruppen der Formel $-\text{CH}_2\text{NHA}$, worin A die vorstehend angegebene Bedeutung besitzt, Thiomethylether der Formel $-\text{CH}_2\text{SR}$, eine Äthinyloxygruppe der Formel $-\text{CH}_2\text{OC}\equiv\text{CH}$, substituierte Äthinyloxygruppen der Formel $-\text{CH}_2\text{OC}\equiv\text{CR}$, eine Vinyloxymethylgruppe der Formel $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CH}_2$, substituierte Vinyloxymethylgruppen der Formeln $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CHR}$ oder $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CRR}$ oder eine Nitrooxygruppe der Formel $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$. R ist in jeder der vorstehend genannten Formeln ein Kohlenwasserstoffrest oder ein vorstehend definierter substituierter Kohlenwasserstoffrest.

Als spezifische Beispiele derartiger labiler Estergruppen seien folgende genannt: Methoxymethyl-, Tetrahydropyranyloxomethyl-, Phenacyloxymethyl-, Acetoxymethyl-, Butyryloxomethyl-, Isobutyryloxomethyl-, Pivaloyloxomethyl-,

Benzoyloxymethyl-, 2-Methylbenzoyloxymethyl-, 2,6-Dimethylbenzoyloxymethyl-, 2-Methyl-6-chlorbenzoyloxymethyl-, 3-Trifluoromethylbenzoyloxymethyl-, 2-Nitrobenzoyloxymethyl-, 2-Methylthiobenzoyloxymethyl-, 2-Thienylcarbonyloxymethyl-, 2-Furylcarbonyloxymethyl-, 3-Pyridylcarbonyloxymethyl-, Pyrazinylcarbonyloxymethyl-, 2-Methylcyclopentylcarbonyloxymethyl-, 1-Adamantylcarbonyloxymethyl-, Phenylsulfonylmethyl-, Phosphonoxymethyl-, Diäthylphosphonoxymethyl-, Carbäthoxyoxymethyl-, Carbamoyloxymethyl-, N-Methylcarbamoyloxymethyl-, N,N-Dimethylcarbamoyloxymethyl-, Phenylsulfamoyloxymethyl-, Acetaminomethyl-, Benzoylaminomethyl-, Methylthiomethyl-, Phenylthiomethyl-, Vinyloxymethyl-, 1-Methylvinyloxymethyl- und Nitrooxymethylgruppen.

Die folgenden Beispiele erläutern Ausführungsformen der Erfindung.

Beispiel 1

Einfluss der Kombination von Glycerin oder DL- α -Glycerinphosphat mit Phosphonomycin auf dessen Inhibierung verschiedener Bakterienstämme

Übernacht-Kulturen der angegebenen Stämme in Nährlösung (Difco) wurden 100fach verdünnt, und eine aliquote Menge von 0,05 ml wurde über die Oberfläche einer 2 mm tiefen Schicht des angegebenen festen Wachstumsmediums in 50 cm² Petri-Schalen gewischt. Empfindliche Scheiben aus einem Filterpapierkreis von 7 mm Durchmesser, der entweder 5 oder 30 μ g Phosphonomycin mit einer zusätzlichen Menge Glycerin oder Dinatrium-DL- α -glycerinphosphat enthielt, wurden auf die Oberfläche des beimpften Agars gebracht. Nach 18stündiger Inkubierung bei 37° C wurden Inhibierungszonen gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

14 127

16

Stamm	Medium	µg P	Zonengrösse mm Durchmesser				
			P	A	B	C	D
E.coli MB. 2489	Nähragar	5	11	45	40	10	0
E. coli MB. 2498	Nähragar	30	13	13	12	13	0
E. coli MB. 2489 A2	Nähragar	5	8	47	43	10	0
E. coli MB. 2017	Nähragar	5	12	29	26	16	0
Pseudo. aeruginosa T 9	Nähragar	5	15	40	18	15	0
Pseudo. aeruginosa T 19	Nähragar	30	18	31	29	16	0
Pr. mirabilis T 10	Mueller Hinton Agar	5	21	25	23	23	23
D. pneumoniae I 37	Nähragar + 10 % Pferdeserum	30	10	15	-	16	-
D. pneumoniae I 37	Gehirn-Herz- Infusion + 10 % Pferdeserum	30	12	14	-	15	-
D. pneumoniae I 2483	Gehirn-Herz- Infusion + 10 % Pferdeserum	30	10	13	-	14	-
Strep. Pyoge- nes 3009	Gehirn-Herz- Infusion + 10 % Pferdeserum	30	15	19	-	18	0
Strep. pyoge- nes 1685	Gehirn-Herz- Infusion + 10 % Pferdeserum	30	14	17	-	13	0
Sal. schott- muelleri 1814	Gehirn-Herz- Infusion	30	11	19	-	12	-
Sal. typhimur- ium MB 1995	Gehirn-Herz- Infusion	30	15	19	-	15	-
Sal. typhosa. 2866	Gehirn-Herz- Infusion	30	19	22	-	19	-

Schlüssel hinsichtlich der Identität und Menge des zu der Scheibe in Kombination mit Phosphonomycin zugesetzten Potentiators;

P - Phosphonomycin (Dinatriumsalz) (Mengeⁱⁿ der Spalte links angegeben)

A - Glycerin, 10 mg

B - Glycerin, 1 mg

C - DL- α -Glycerinphosphat, Dinatriumsalz, 10 μ g

D - DL- α -Glycerinphosphat, Dinatriumsalz, 100 μ g

Es ist ersichtlich, dass Glycerin über ein breites Spektrum von Stämmen synergetisch wirkt und lediglich im Fall von *E. coli* 2498 (einem Mutanten-Derivat von MB 2489), das bekanntlich keine α -Glycerinphosphat-Transportwirksamkeit aufweist, und *Proteus mirabilis* (T 10) versagt. Der letztere Stamm hat gemeinsam mit allen geprüften, empfindlichen *Proteus*-Arten ein sehr wirksames α -Glycerinphosphat-Transportsystem, das mit grösster Wahrscheinlichkeit konstitutiv, d. h. kein Gegenstand weiterer Induktion ist.

Einige bedeutende Beispiele erhöhter Empfindlichkeit werden bei dem geringen Wert an zugesetztem Dinatrium-DL- α -glycerinphosphat beobachtet, selbst obgleich es ein bekanntes Induziermittel des Transportsystems wenigstens in MB 2489 ist. Etwas Antagonismus ist bei dem zu der Scheibe zugesetzten hohen Wert (100 μ g) nachweisbar. Dieses Phänomen stellt vermutlich die erwartete Konkurrenz zwischen Phosphonomycin und α -Glycerinphosphat für ihr übliches Transportsystem dar. Im Gegensatz dazu ist Glycerin, obgleich ein Induziermittel, kein Substrat, und besetzt daher vorher nicht das Transportsystem, dessen Aktivität es angeregt hat.

Beispiel 2

18

Einwirkung von Glucose-6-phosphat auf die Empfindlichkeit von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* gegenüber Phosphonomycin in flüssigem Medium verschiedener Zusammensetzung

Übernacht-Flüssigkeitskulturen wurden auf 1 : 10 000 (10^5 Zellen/ml) in dem angegebenen Medium verdünnt und mit einem gleichen Volumen eines Mediums vereinigt, das verschiedene Mengen an Dinatriumphosphonomycin enthielt. Die minimale Inhibierungskonzentration (M.I.C.) war die Endkonzentration an Phosphonomycin, unterhalb der nach einer 24stündigen Inkubierung bei 35° C Trübung beobachtet wurde.

Medium	M.I.C. µg/ml <i>Staphylococcus aureus</i> MB 2949	Phosphonomycin <i>Escherichia coli</i> MB 2017
Mueller Hinton-Flüssigkeit (Difco)	50	3,12
Mueller Hinton-Flüssigkeit plus Dinatriumglucose-6-phosphat, 25 µg/ml	3,12	0,78
Nährlösung (Difco)	25	12,5
Nährlösung (Difco) plus Dinatriumglucose-6-phosphat	1,5	0,39
Nährlösung (Difco) plus 5 % V/V defibriniertes Schafblut (Gibco)	3,12	0,39

Bei beiden Medien wurde festgestellt, dass Glucose-6-phosphat mit einem Faktor von 4 bis 40 die Empfindlichkeit von gram-positiven und gram-negativen Pathogenen wirksam macht. In Nährflüssigkeit wird der mit Glucose-6-phosphat beob-

achtete Effekt dem mit Schafblut beobachteten nachgeahmt.

B e i s p i e l 3

Einfluss von Glucose-6-phosphat auf die Fraktion von Bakterienbeständen, die bei einem gegebenen Phosphonomycinwert überlebt.

Es wurden verschiedene Verdünnungen von Übernacht-Kulturlösungen der bezeichneten Bakterienstämme über die Oberfläche von Petri-Schalen gewischt, welche Mueller Hinton-Medium, 1,5 % Agar (Difco) enthielten und mit den angegebenen Werten an Dinatriumphosphonomycin mit oder ohne 25 µg/ml Dinatriumglucose-6-phosphat ergänzt waren. Aus der Anzahl der bei einer speziellen Verdünnung an gegebenem Organismus vorliegenden Kolonien wird die Anzahl der überlebenden, zugeführten Zellen bei einem gegebenen Phosphonomycinwert mit und ohne Glucose-6-phosphat berechnet, wobei die Werte in der folgenden Tabelle wiedergegeben sind:

Stamm	$\mu\text{g/ml}$ Phosphonomycin	Anzahl der überlebenden Kolonienbildner je ml	
		Mueller Hinton Agar allein	Mueller Hinton Agar plus 25 $\mu\text{g/ml}$ Glucose-6-phosphat
Escherichia coli MB 2017	0	3×10^9	3×10^9
	10	3×10^5	5×10^2
	30	3×10^5	50
	100	3×10^5	< 10
Staphylococcus aureus MB 2949	0	3×10^9	3×10^9
	10	3×10^5	3×10^5
	30	3×10^5	< 100
	100	3×10^3	< 10
Aerobacter aerogenes MB 3287	0	7×10^8	5×10^8
	10	3×10^7	1×10^5
	30	5×10^5	5×10^4
	100	3×10^5	5×10^2
Staphylococcus aureus MB 3036	0	2×10^8	2×10^8
	10	2×10^5	1×10^3
	30	2×10^4	1×10^3
	100	< 10	< 10
Shigella sp. MB 3298	0	2×10^8	2×10^8
	10	3×10^7	1×10^3
	30	3×10^7	1×10^3
	100	1×10^4	6×10^2

In allen Fällen überlebt ein geringerer Anteil des zugeführten Bakterienbestandes unter Bildung von Kolonien auf der Platte, die Glucose-6-phosphat enthält, als auf der Platte, die diese Wirkstoffkonzentration nicht enthält. In den meisten Fällen wird der wesentliche verbleibende Bestand (in der Grössenordnung von $1 \text{ in } 10^3$ bis $1 \text{ in } 10^4$), der hohe Ausmasse an Phosphonomycin überlebt, ausgerottet oder weitgehend reduziert, wenn Glucose-6-phosphat gleichfalls vorliegt. Eine Empfindlichmachung der Bestandmasse und eine Beseitigung von resistentem Bestand sind offensichtlich, wenn dieses Induziermittel vorliegt.

Beispiel 4

Einfluss von Glucose-6-phosphat auf die Grösse der Inhibierungszone, welche die empfindlichen Scheiben umgibt, die dieses Zuckerphosphat in Kombination mit Phosphonomycin enthalten

Übernacht-Kulturen der angegebenen Stämme, die in Difco-Nährlösung gezüchtet waren, wurden 100fach verdünnt, und eine aliquote Menge von 0,05 ml wurde über die Fläche einer Petri-Schale gewischt, die 10 ml Mueller Hinton Agar (Difco) enthielt. Empfindlichkeitsscheiben, die aus Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 7 mm bestanden und entweder 5 oder 30 µg Dinatriumphosphonomycin mit oder ohne zusätzlichem 5 µg Dinatriumglucose-6-phosphat enthielten, wurden auf die Oberfläche des beimpften Agars gebracht. Inhibierungszonen wurden nach 18stündiger Inkubierung bei 37° C gemessen.

14127

21

Bakterienstamm	Durchmesser der Inhibierungszone in mm			
	5 μ g Phosphonomycin ohne Glucose-6- phosphat	- 30 μ g	5 μ g Phosphonomycin plus Glucose-6-phosphat	- 30 μ g
Escherichia coli MB 2017	11	16	20	24
Staphylococcus aureus MB 2949	0	11	13	20
Aerobacter aerogenes MB 3287	0	0	16	26
Staphylococcus aureus MB 3036	0	30	27	40
Shigella sp. MB 3298	0	10	24	37

Die in dem früheren Beispiel vermerkte Empfindlichmachung von Zellen durch Glucose-6-phosphat zeigt sich hier durch eine wesentliche Steigerung der Inhibierungszone, welche die Scheiben umgibt, die ein Gemisch aus Phosphonomycin und Glucose-6-phosphat enthalten. Es ist ferner bemerkenswert, dass in sämtlichen Fällen, in denen Zonenvergrößerung in Gegenwart von Glucose-6-phosphat beobachtet wird, festgestellt wurde, dass der inhibierte Bereich relativ frei von den unzähligen arzneimittelbeständigen Kolonien ist, welche eine Scheibe aus Phosphonomycin selbst umgeben. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit der Erschliessung eines wechselnden Weges für den Eintritt von Phosphonomycin in Zellen, welche ihren normal ausgedrückten α -Glycerinphosphat-Transportweg verloren haben, durch Glucose-6-phosphat.

Beispiel 5

Beispiel einer Methode zum Sieben von Phosphatestern
als Induziermittel für latente Transportsysteme von
Phosphonomycin in *Escherichia coli*

Der Stamm *Escherichia coli* MB 2498 ist einein Tabelle I des Journal of Molecular Biology, 31, 371 (1968) beschriebene Subkultur der Mutante 6. Ihm fehlt die Fähigkeit, auf L- α -Glycerinphosphat zu wachsen oder sich dort anzusammeln, und er ist beständig gegenüber Phosphonomycinwerten bis zu 70 $\mu\text{g/ml}$ in Nährlösung. (Der wilde Ausgangsstamm ist durch 10 $\mu\text{g/ml}$ Dinatriumphosphonomycin vollständig gehemmt.) MB 2498 besitzt auch keine alkalische Phosphatasewirksamkeit und zersetzt exogene Phosphatester zu einem minimalen Ausmass.

Bei der Suche nach Induziermitteln für zusätzliche Transportsysteme für Phosphonomycin wurden 0,05 ml einer Suspension von 10^7 Zellen/ml über die Oberfläche einer 50 cm^2 -Petri-Schale geschmiert, die 10 ml Nährflüssigkeit, 1,5 % Agar (Difco) und 25 $\mu\text{g/ml}$ Dinatriumphosphonomycin enthielt. Papierscheiben von 7 mm Durchmesser, und welche 0,25 ml Lösungsmittel absorbieren konnten, wurden mit Lösungen verschiedener Phosphatester behandelt und auf die Agar-Oberfläche aufgebracht. Inhibierungszonen wurden nach 18stündiger Inkubierung bei 37° C gemessen.

Getestete Verbindung	μg in der Scheibe	Inhibie- rungszone mm Durch- messer
keine	-	0
Dinatrium-glucose-6-phosphat	1,0	31
	0,5	27
	0,1	18
Dinatrium-fructose-6-phosphat	10,0	42
Dinatrium-mannose-6-phosphat	6,0	31
Dinatrium-2-desoxy-glucose-6-phosphat	1,0	27
Dinatrium-2-amino-2-desoxyglucose-6-phosphat	25,0	34
Dinatrium-ribose-5-phosphat-monohydrat	25	35
Phosphatidyl-äthanolamin	30	29
Tetrakalium-glucose-1',6'-diphosphat-pentahydrat	25	34
Dinatrium-glucose-1-phosphat	25	31
Dimagnesium-5-phosphoryl-ribose-1-pyrophosphat-dihydrat	25	25
Dinatrium-riboflavin-5-phosphat	25	14

Unter den Verbindungen des obigen Versuchs, die keine Wirksamkeit bei einem Wert von 25 μg je Scheibe zeigten, waren: Inosit-phosphat, Adenosin-5'-phosphat, Galactose-1-phosphat, 2'-Desoxyribose-1'-phosphat, α -D-Ribose-1-phosphat, β -D-Ribose-1-phosphat, α -D-Xylopyranose-1-phosphat, Glucon-6-phosphat, Mannose-1-phosphat, Erythrose-4-phosphat, Pyridoxin-phosphat, Thiamin-monophosphat, D-Galactose-6-phosphat, D-Fructose-1-phosphat, Fructose-1,6-diphosphat, Phosphoserin, Phosphatidyl-cholin, N,N-Dimethyl-L-phosphatidyl-äthanolamin sowie eine grosse Anzahl nicht-phosphorylierter Tetrosen, Pentosen und Hexosen. Die Potentiationserscheinung zeigt also einen Grad an Spezifität, der im Fall der Hexosephosphate in erster Linie solche Verbindungen einzu-

schliessen scheint, die durch Hexokinase erzeugt werden, und zu denen solche Hexosephosphate gehören, die bekanntlich das Glucose-6-phosphat-Transportsystem (Verbindungen 1, 2, 3, 4 und 9) induzieren.

Keine der wirksammachenden Verbindungen erzeugte bei den getesteten Werten Inhibierungszonen bei mit MB 2498 beimpften Platten, die aus Nährlösung/Agar ohne MK 955 bestanden.

B e i s p i e l 6

Einfluss der Kombination verschiedener Phosphatester auf die Inhibierung verschiedener Bakterienstämme

Übernacht-Kulturen der angegebenen Stämme in Nährlösung (Difco) wurden 100fach verdünnt, und es wurde eine aliquote Menge von 0,05 ml über die Oberfläche einer 2 mm tiefen Schicht des angegebenen festen Wachstumsmediums gewischt. Empfindlichkeitsscheiben, bestehend aus kreisförmigen Filterpapierscheiben von 7 mm Durchmesser, die entweder 5 oder 30 µg Dinatriumphosphonomycin mit einer zusätzlichen Menge der angegebenen Phosphatester enthielten, wurden auf die Oberfläche des beimpften Agars gebracht. Inhibierungszonen wurden nach 18stündiger Inkubierung bei 37° C gemessen.

14127

26

Stamm	P µg	Zonengrösse mm Durchmesser (vergleiche Schlüssel für die zugesetzten Phosphatester)									
		P	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MB 2489	5	11	25	25	20	30	22	21	18	15	22
MB 2489 A2	5	8	10	10	10	10	21	10	11	10	10
MB 2498	30	13	33	33	26	24	21	31	26	21	30
MB 24980	30	11	12	10	10	12	14	10	11	11	12
MB 2017	5	12	23	22	20	17	16	21	19	17	19
T 14	5	0	13	15	0	0	0	12	0	0	0
T 27	30	0	20	20	0	0	0	18	13	0	14
T9	5	15	16	15	15	15	12	15	16	16	16
T 10	5	21	23	23	23	23	22	22	22	23	23
T 19	30	18	17	17	17	15	18	15	17	17	15

Schlüssel hinsichtlich der Art und Menge der zu den Scheiben zusammen mit Phosphonomycin zugegebenen Phosphatester:

P - Dinatriumsalz des Phosphonomycins (Menge in der linken Spalte angegeben)

A - Glucose -6-phosphat, 5 µg

B - 2'-Desoxy-glucose-6-phosphat, 5 µg

C - Ribose-5-phosphat, 26 µg

D - Phosphatidyl-äthanolamin, 25 µg

E - Riboflavin-5-phosphat, 50 µg

F - Fructose-6-phosphat, 5 µg

G - Mannose-6-phosphat, 5 µg

H - 2-Amino-2-desoxy-glucose-6-phosphat, 25 µg

I - Glucose-1-phosphat, 25 µg

Der Stamm MB 2489 ist ein Escherichia coli-Stamm, der gut auf α-Glycerinphosphat und D-Glucose-6-phosphat wächst. Er ergibt ^{auf} Nährflüssigkeit Agar mässige Empfindlichkeit gegenüber Phosphonomycin, die durch die ganze Reihe der Hexose-phosphatester (A, B, F, G, I), von denen bekannt ist, dass

sie den Glucose-6-phosphat-Transportweg induzieren, wesentlich gesteigert wird.

Der Stamm MB 2489 A2 wurde von der Peripherie der gesteigerten Inhibierungszone, welche eine Phosphonomycin ($5 \mu\text{g}$) und Glucose-6-phosphat ($25 \mu\text{g}$) enthaltende Scheibe umgibt, isoliert. Es wurde gefunden, dass er auf α -Glycerinphosphat gut wächst, jedoch keine Stimulierung des Wachstums durch Glucose-6-phosphat ergibt. Obgleich dieser Stamm ebenso empfindlich gegenüber Phosphonomycin allein wie der Ausgangsstamm MB 2489 ist (wie erwartet, da sein α -Glycerinphosphat-Transportsystem wirksam ist), versagt er hinsichtlich der Anregung des Nährlösungsagar durch irgendeinen der Hexosephosphat-Induziermittel des Glucose-6-phosphat-Transportsystems. Ferner ergibt sich aus dem Versagen des Ribose-5-phosphats und Phosphatidyl-äthanolamins hinsichtlich einer synergistischen Wirkung, dass diese Ester auch das Glucose-6-phosphat-Transportsystem induzieren. Jedoch deutet die noch durch Riboflavin-5-phosphat hervorgerufene Wirksamkeit auf das Vorliegen noch eines dritten induzierbaren Weges, der einen gesteigerten Phosphonomycin-Transport vermittelt.

Der Stamm MB 2498 ist eine Mutante von MB 2489, der keinen α -Glycerinphosphatweg besitzt (d. h., er wächst nicht auf α -Glycerinphosphat, behält jedoch das induzierbare Glucose-6-phosphat-System bei). Obgleich er weniger empfindlich auf Agar-Nährlösung gegenüber Phosphonomycin ist wie MB 2489, behält er die Fähigkeit bei, durch die Phosphat-ester-Induziermittel angeregt zu werden.

Der Stamm MB 24980 wurde als eine resistente Kolonie von einer Platte isoliert, die $25 \mu\text{g/ml}$ Phosphonomycin und $25 \mu\text{g/ml}$ Glucose-6-phosphat enthielt. In Übereinstimmung

mit den obigen Ergebnissen wurde seine Empfindlichkeit auf Agar-Nährlösung gegenüber Phosphonomycin einzig durch Riboflavin-5-phosphat gesteigert.

Der Stamm MB 2017 ist ein für Mäuse pathogener *Escherichia coli*. Er ergibt weitgehende Sensibilisierung auf Agar-Nährlösung durch die gesamte Klasse der Phosphatester-Induziermittel.

Der Stamm T 14 ist eine *Klebsiella Species*, die aus dem Urin eines Patienten unmittelbar vor Aufnahme der Phosphonomycin-Therapie isoliert worden war; T 27 ist eine *Klebsiella Species*, die aus dem Urin eines Patienten isoliert wurde, der seit 7 Tagen einer oralen Phosphonomycin-Therapie unterzogen worden war. Beide Stämme sind auf Agar-Nährflüssigkeit gegenüber Phosphonomycin selbst resistent, zeigen jedoch in Anwesenheit einer Vielzahl von Induziermitteln des Glucose-6-phosphat-Weges mittlere Sensibilisierung.

Die Stämme T 9 und T 19 sind Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*, die auf dem Urin infizierter Menschen isoliert wurden. Die Stämme zeigten keine merkliche Empfindlichkeit auf Agar-Nährlösung gegenüber den obigen Phosphatestern.

Der Stamm T 10 ist ein *Proteus mirabilis*-Stamm, der aus dem Urin eines infizierten Menschen isoliert worden war und zeigte keine merkliche Empfindlichkeit auf Mueller Hinton Agar gegenüber irgendeinem der obigen Phosphatester.

Beispiel 7

Aufgetretener Einfluß in verschiedenen Wachstumsmedien von Glucose-6-phosphat auf die Größe der Inhibierungszone, welche die Empfindlichkeitsscheiben, die dieses Zuckerphosphat in Kombination mit Phosphonomycin enthalten, ausüben

Eine Übernacht-Kultur von *Escherichia coli*, MB 2489, die auf Nährlösung wuchs, wurde 100fach verdünnt, und eine aliquote Menge von 0,05 ml wurde über die Oberfläche eines 2 mm tiefen Agar-Mediums aufgewischt, das entweder aus Nährlösung, 1,5 % Agar (Difco), Gehirn-Herz-Infusion, 1,5 % Agar (Difco), Mueller Hinton Agar (Difco), Trypticase-Soja Agar (BBL) oder einem "menschlichen Urin-Agar" bestand. Das letztere Medium wurde hergestellt, indem unmittelbar nach dem Schlaf gesammelter Urin von erwachsenen Männern zentrifugiert wurde, das überstehende Material zur Erzielung von Sterilität durch eine Membran filtriert wurde und das Filtrat mit einem Zehntel Volumen autoklaviertem 15%igen Noble-Agar (Difco) in Wasser zur Erzeugung eines festen Mediums kombiniert wurde. Empfindlichkeitsscheiben aus einer Filterpapierscheibe von 7 mm Durchmesser, die 5 oder 30 µg Dinatriumphosphonomycin mit und ohne Dinatrium-glucose-6-phosphat enthielt, wurden auf die Oberfläche des beimpften Agars gebracht. Inhibierungszonen wurden nach 18stündiger Inkubierung bei 37 °C gemessen.

Verwendetes Medium	Durchmesser der Inhibierungszone (mm)			
	5 µg Phosphonomycin allein	30 µg Phosphonomycin	5 µg Phosphonomycin plus Glucose-6-phosphat (25 µg)	30 µg Phosphonomycin plus Glucose-6-phosphat (25 µg)
Nährlösung.	12	24	28	33
Mueller Hinton- Lösung	0	14	20	26
Gehirn-Herz- Infusion	0	12	16	20
Trypticase-Soja- Lösung	0	15	18	24
Menschlicher Urin	9	19	14	26

Der Aktivität von Phosphonomycin allein wird in Bezug auf die Nährlösung in dem anderen verwendeten Medium eindeutig entgegengewirkt. Dieser Antagonismus kann zu einem überwiegenden Ausmass ^{auf} die hohen Werten an Natriumchlorid in Mueller Hinton-Lösung, Glucose und Phosphat in Gehirn-Herz-Infusion und Trypticase-Soja und Phosphationen im menschlichen Urin zurückzuführen sein. Dieses nachteilige Phänomen wird im wesentlichen durch den Einschluss von Glucose-6-phosphat in die Empfindlichkeitsscheibe beseitigt.

Beispiel 8

Einwirkung von Glucose-6-phosphat auf die Empfindlichkeit von *Escherichia coli*-Stämmen auf verschiedene Phosphonomycinanaloge

Übernacht-Kulturen von *Escherichia coli*, Stamm MB 2489 (der sowohl das α -Glycerinphosphat-Transportsystem als das Glucose-6-phosphat-Transportsystem besitzt) und MB 2498 (der lediglich den Glucose-6-phosphat-Weg aufweist und daher gegenüber Phosphonomycin allein relativ

beständig ist) wurden 100fach verdünnt, und eine aliquote Menge von 0,05 ml wurde über die Oberfläche einer 2 mm Nährlösung aus 1,5 % Agar (Difco) aufgewischt. Empfindlichkeitsscheiben aus einer Papierscheibe von 7 mm Durchmesser, welche Dinatrium-phosphonomycin oder eines der angegebenen Analogen in den angegebenen Mengen zusammen mit weiteren 5 µg Dinatriumglucose-6-phosphat, wo angegeben, enthielt, wurden auf die Oberfläche des beimpften Agars gebracht. Inhibierungszonen wurden nach 18stündiger Inkubierung bei 37° C gemessen.

Wirksame Substanz	Menge µg	MB 2489		MB 2498	
		kein G- 6-P	+ G- 6-P	kein G- 6-P	+ G- 6-P
Phosphonomycin	5	14	28	0	30
	2,5	12	25	0	24
	1,0	0	20	0	24
	0,3	0	18	0	15
Monodicyclohexylamin- salz der 1-Methyl-1,2- epoxyäthylphosphon- säure	500	20	38	9	42
	50	0	32	0	36
	5	0	13	0	16
Dicyclohexylammonium- salz der 1,2-Epoxy- äthylphosphonsäure	500	16	35	8	38
	50	0	26	0	29
	5	0	10	0	12

Es wurde festgestellt, dass Glucose-6-phosphat die Empfindlichkeit von Phosphonomycin-empfindlichen und -resistenten Stämmen wirksam macht, so dass sie nun auf schwache Analoge von Phosphonomycin zum gleichen Ausmass wie auf Phosphonomycin selbst ansprechen.

Beispiel 9

Einwirkung von Phosphonomycin und Glucose-6-phosphat und deren Kombinationen bei der Behandlung von infizierten Mäusen

Weibliche C.D.1.-Mäuse eines mittleren Molekulargewichts von 22,5 g wurden intraperitoneal mit 16stündigen Kulturflüssigkeiten, die in Gehirn-Herz-Infusion entsprechend verdünnt waren, infiziert. Für E. coli enthielt der Ansprehwert $2,5 \times 10^7$ Zellen oder Dosierungen von 7 LD₅₀; für Shigella $2,3 \times 10^8$ Zellen oder Dosierungen von 3 LD₅₀. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden das Dinatriumsalz des Phosphonomycins und Natriumglucose-6-phosphat getrennt in 0,25 ml subkutan an einer gesonderten Stelle verabreicht, eine auf jeder Seite der Rückfläche. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Test-Organismus	ED ₅₀ subkutan						
	G-6-P	Dinatrium-		DSP +		DSP+0,1 mg	
	µg	phosphonomycin (DSP)	%	1,0 mg G-6-P	%	G-6-P	%
		µg		µg		µg	
Escherichia coli 2017	>4000	155	100	12	8	91	58
Shigella (118-57) 3303	>4000	1000	100	82	8	1500	150

Beispiel 10Einfluss von Phosphonomycin und Glucose-6-phosphat sowie deren Kombinationen bei der Behandlung infizierter Mäuse

Bei weiteren Mäusetests, die, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit der Ausnahme durchgeführt wurden, dass das Antibiotikum mit dem Natriumglucose-6-phosphat kombiniert wurde und in einer Injektion verabreicht wurde, wurden die folgenden Ergebnisse bei infizierten Mäusen mit *Aerobacter aerogenes* und *Staphylococcus aureus* erhalten:

Test-Organismus	Dinatriumphosphonomycin (DSP) s.c.					G-6-P ED ₅₀ allein verwen- det (µg)
	ED ₅₀ in µg					
	DSP allein	µg zu DSP 4000	1000	500	100	
Aerobacter aerogenes 3148	10 000+	287	3 000	7 700	10 000	>4 000
Staphylococcus aureus Smith 2949	96	22	50			>4 000

Beispiel 11Einfluss von Fructose-6-phosphat bei der Wirksammachung von Phosphonomycin in Mäusen

Die Wirkung von Fructose-6-phosphat bei der Wirksammachung der Bekämpfung experimenteller Bakterieninfektionen durch Phosphonomycin in Mäusen wurde mit der von Glucose-6-phosphat in Versuchen gemäss dem Ablauf nach Beispiel 10 verglichen. Das Antibiotikum wurde wieder mit dem Zuckerphosphat kombiniert in einer einzigen subkutanen Injektion zum

Zeitpunkt der intraperitonealen Beimpfung mit *Escherichia coli* MB 2017 verabreicht.

Wirksammachendes Mittel	Dosis (μ g)	ED ₅₀ , μ g Phosphonomycin
Kein	-	2000
Dinatriumglucose-6-phosphat	1000	17
	600	31
	300	69
	100	470
Dinatriumfructose-6-phosphat	1000	17
	600	57
	300	202
	100	534

Es ist ersichtlich, dass Fructose-6-phosphat ein Ausmass an Wirksammachung gegenüber Phosphonomycin ausübt, das mit demjenigen vergleichbar ist, das vorher in den Parallelversuchen mit Glucose-6-phosphat beobachtet wurde. Diese Äquivalenz wurde sowohl aus der gleichen Steigerung der in vitro beobachteten Inhibierung in Beispiel 5 erwartet, wenn eines dieser Zuckerphosphate mit Phosphonomycin kombiniert wurde, als aus der Sicherheit ihrer Umwandlung durch die im Plasma vorliegende ausreichende Phosphoglucose-isomerase-Aktivität.

Beispiel 12

Therapeutische Wirkung von Phosphonomycin, das oral an infizierte Mäuse verabreicht wurde, die Glucose-6-phosphat entweder auf oralem oder subkutanem Weg aufnehmen

Das Vorgehen nach Beispiel 9 wurde für den Fall von *Escherichia coli* 2017 mit der Ausnahme wiederholt, dass unmittelbar nach der Infektion das Dinatriumsalz des Phosphonomycins oral verabreicht wurde, während Dinatriumglucose-6-

phosphat, wo angegeben, entweder oral oder auf subkutanem Wege verabreicht wurde. In keinem Fall wurde ein Schutz beobachtet, wenn Glucose-6-phosphat allein bei dem Wert von 4000 µg oral oder subkutan in Abwesenheit von Phosphonomycin verabreicht wurde.

Glucose-6-phosphat µg	Weg	Dosis an oral verabreichtem Phosphonomycin (µg), die 50 % der Tiere schützt (ED ₅₀)
0	-	2000
1000	oral	2000
100	subkutan	37

Glucose-6-phosphat ist ein wirksamer Therapiepotentiator für oral verabreichtes Phosphonomycin (25fache Sensibilisierung), wenn Zuckerphosphat subkutan verabreicht wird. Es wird keine Sensitivierung beobachtet, wenn das Zuckerphosphat oral mit diesem Wert verabreicht wird.

Beispiel 13

Therapeutische Wirksamkeit von Phosphonomycin, das parenteral an infizierte Mäuse, die oral Glucose-6-phosphatsalze aufnehmen, verabreicht wurde

Das Vorgehen nach Beispiel 9 wurde für den Fall von *Escherichia coli* 2017 mit der Ausnahme wiederholt, dass unmittelbar nach Infektion das Dinatriumsalz des Phosphonomycins subkutan verabreicht wurde, während Glucose-6-phosphat in der angegebenen Form oral durch Gabe in 0,25 ml Wasser verabreicht wurde. In keinem Fall wurde Schutz bei Verabreichung der Glucose-6-phosphatsalze allein beobachtet, noch verursachte die orale Verabreichung allein von 2,5 mg n-Octylammoniumchlorid (ohne Glucose-6-phosphat) eine Ab-

nahme des ED_{50} -Wertes von gleichzeitig parenteral verabreichtem Phosphonomycin. Die n-Octylammoniumsalze des Glucose-6-phosphats wurden durch Überführung des Dinatriumsalzes in die freie Säure durch Hindurchleiten durch eine Kolonne, die einen 20fachen Überschuss an Dowex-50 (H^+ -Form) enthielt, anschliessende Neutralisierung von Anteilen des Eluats mit je 0,7, 1,5 oder 2,0 molaren Äquivalenten der freien n-Octylaminbase und 1,3, 0,5 bzw. 0 molaren Äquivalenten NaOH unter Erzielung eines pH-Wertes von 7,5 in jedem Fall hergestellt.

Glucose-6-phosphatsalz
(mg)

Dosis an Phosphonomycin, welche 50 % der Tiere schützt (ED_{50})
(μg)

Versuch I

	kein	500
Dinatrium- salz	100	27
	50	63
	25	125
	12,5	302
	6,25	531
Natrium 0,5 + n-Octyl- ammonium 1,5	10	66
	1	302

Versuch II

	kein	827
Di-n-octyl- ammonium	5	125
Natrium 0,5 n-Octyl- ammonium 1,5	5	468
Natrium 1,3 n-Octyl- ammonium 0,7	5	714

Oral verabreichtes Glucose-6-phosphat macht die Phosphonomycin-Therapie wirksam und wird in dieser Richtung im Verhältnis zu dem Anteil an anorganischem Gegenion, das durch lipophiles Amin ersetzt ist, noch wirksamer gemacht.

B e i s p i e l 14

Wirksammachung der Phosphonomycin-Therapie durch gleichzeitig verabreichtes Galactose-6-phosphat bei mit Staphylococci infizierten Mäusen

Eine Untersuchung der Wirkung von Galactose-6-phosphat hinsichtlich der Wirksammachung der Bekämpfung experimentell in Mäusen erzeugter Staphylococcen-Infektionen durch Phosphonomycin wurde durch die bei einer Anwendung der in Beispiel 6 beschriebenen Methodologie auf diesem Stamm ermittelten Feststellung gerechtfertigt, dass 25 µg dieses Zuckerphosphats, wenn es zu einer Empfindlichkeitsscheibe, die 5 µg Phosphonomycin enthält, zugegeben wurde, eine Inhibierungszone von 21 mm erzeugt im Gegensatz zu der nicht mit Zusatz versetzten Scheibe mit einer Zone von 17 mm, wenn die Scheiben auf eine mit Staphylococcus aureus Smith 2949' beimpfte Nähragarplatte gebracht wurden. In dem folgenden Therapieversuch wurde das Antibiotikum mit dem Zuckerphosphat vereinigt in einer einzigen subkutanen Injektion zum Zeitpunkt der intraperitonealen Injektion mit 10^6 Zellen je Maus ($14 LD_{50}$) verabreicht, wobei die Zellen 16 Stunden in Gehirn-Herz-Infusion gewachsen waren.

Potentiator	Dosis (μ g)	ED ₅₀ (μ g Phosphonomycin)
kein	-	212
Dinatrium-glucose-6-phosphat	4000	91
Dinatrium-galactose-6-phosphat	4000	25

Die Wirkung von Galactose-6-phosphat als ein Potentiator wird durch die nachgewiesene Existenz eines induzierbaren Galactose-6-phosphat-Transportsystems in Staphylococcus erklärt. Galactose-6-phosphat ist ein Metabolit der Lactosehydrolyse einzig zu gewissen gram-positiven Organismen, wird jedoch nicht durch E. coli erzeugt oder davon verwendet. Darauf ist das Versagen von Galactose-6-phosphat zur Wirksammachung der Phosphonomycin-Wirkung auf E. coli zurückzuführen (Beispiel 5).

Beispiel 15

Wirkung von Mannose-6-phosphat hinsichtlich der Wirksammachung von Phosphonomycin in Mäusen

Die Wirkung von Mannose-6-phosphat hinsichtlich der Wirksammachung der Bekämpfung experimenteller Infektionen in Mäusen durch Phosphonomycin wurde mit der von Glucose-6-phosphat in Versuchen nach den Vorschriften des Beispiels 10 verglichen. Das Antibiotikum wurde wieder in Kombination mit einer Reihe feststehender Werte an Zuckerphosphaten titriert in einer einzigen subkutanen Injektion zum Zeitpunkt der intraperitonealen Beimpfung mit Escherichia coli MB 2017 verabreicht.

Potentiator	Dosis (μ g)	ED ₅₀ (μ g Phosphonomycin)
kein	-	1420
Dinatrium-glucose-6-phosphat	1000	18
Dinatrium-mannose-6-phosphat	1000	19
"	500	23
"	250	92
"	125	490

Mannose-6-phosphat übt ein Ausmass an Wirksammachung gegenüber Phosphonomycin äquivalent zu dem vergleichbarer Glucose-6-phosphat-Werte aus, selbst obgleich dessen Wirkung in vitro nur ein Zehntel derjenigen von Glucose-6-phosphat beträgt. Diese Diskrepanz kann auf die Umwandlung von Mannose-6-phosphat in Glucose-6-phosphat in vivo durch aufeinanderfolgende Einwirkung von Mannose-phosphat-Isomerase und Phosphoglucose-Isomerase zurückgeführt werden, Enzyme, deren Wirksamkeiten in Plasma und in den Wänden von Blutgefässen nachweisbar sind.

Beispiel 16

Wirksammachung der Phosphonomycin-Therapie in Mäusen durch Glucose-1-phosphat und Ribose-5-phosphat

Die Wirkung von Glucose-1-phosphat und Ribose-5-phosphat hinsichtlich der Wirksammachung der Bekämpfung experimenteller bakterieller Infektionen in Mäusen durch Phosphonomycin wurde mit derjenigen von Glucose-6-phosphat in Versuchen gemäss den Angaben nach Beispiel 10 verglichen. Das Antibiotikum wurde wiederum hinsichtlich seiner Heilwirksamkeit in Kombination mit den angegebenen feststehen-

den Werten an Zuckerphosphat titriert in einer einzigen Injektion zum Zeitpunkt der intraperitonealen Beimpfung mit E. coli MB 2017 verabreicht.

Potentiator	Dosis (μg)	ED ₅₀ (μg Phosphonomycin)
kein	-	940
Dinatrium-glucose-6-phosphat	1000	5
Dikalium-glucose-1-phosphat	1000	9
Dinatrium-ribose-5-phosphat *	1000	158

* Bei dieser Probe wurde durch einen spezifischen Versuch mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nachgewiesen, dass sie durch nicht mehr als einen Teil je Tausend Glucose-6-phosphat verunreinigt war.

Die Potentierungsfähigkeit von 1000 μg Ribose-5-phosphat, obgleich bedeutsam, ist nur derjenigen äquivalent, die durch etwa 100 μg Glucose-6-phosphat erzeugt wird (vergleiche Beispiel 11). Dieses Ausmass an relativer Potenz wurde durch das Gewichtsverhältnis von Ribose-5-phosphat zu Glucose-6-phosphat, das äquivalent erhöhte Inhibitionszonen in vitro erzeugt (Beispiel 5), verhindert. Die äquivalenten Wirksamkeiten von Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat in vivo, trotz der Unterschiede in vitro, gehen höchstwahrscheinlich auf die rasche Umwandlung des 1-Phosphats in das 6-Phosphat durch die Einwirkung von bekanntlich im Plasma vorliegender Phosphoglucomutase zurück.

Beispiel 17

Wirksammachung der Phosphonomycin-Therapie in mit Streptococci infizierten Mäusen durch gleichzeitig verabreichte Lactose

Nach Anwendung der in Beispiel 6 beschriebenen Methodologie auf Streptococci wurde festgestellt, dass 250 µg Lactose, die zu einer Empfindlichkeitsscheibe zugegeben wurden, welche 30 µg Phosphonomycin enthielt, eine Inhibierungszone von 27 mm Durchmesser im Vergleich mit einer Zone von 12 mm bei einer Scheibe ohne Zusatz erzeugt, wenn die Scheiben auf eine mit Streptococcus faecalis R. beimpfte Nähragarplatte gebracht wurden. Bei den folgenden Therapieversuchen wurden 14 Kolonien bildende Einheiten (7 LD₅₀) des pathogenen Streptococcus pyogenes (1934), der in Gehirn-Herz-Lösung gewachsen und mit 10%igem Pferdeserum versetzt worden war, intraperitoneal beimpft. Gleichzeitig wurden 0,5 ml entweder einer Lactoselösung oder einer Salzvergleichslösung subkutan injiziert, woran sich in Versuch I eine einzelne orale Dosis von 0,5 ml Phosphonomycin (durch Zwangsgabe) und in Versuch II vier aufeinanderfolgende orale 0,5 ml Dosen von Antibiotikum nach 0, 2, 4 und 6 Stunden nach der Infektion anschlossen.

Potentiator	Dosis (mg)	ED ₅₀ (insgesamt verabreichtes Phosphonomycin, µg)
<u>Versuch I</u>		
kein	-	3950
Lactose	4	1530
<u>Versuch II</u>		
kein	-	2100
Lactose	4	800

Neutrale Saccharide können also die Phosphonomycin-Wirkung sowohl in vivo als auch in vitro wirksammachen bzw. potenzieren. Bestimmte Streptococci, gemeinsam mit Staphylococci, zeigen auch induzierbaren Stoffwechsel von Lactose zu Galactose-6-phosphat.

B e i s p i e l 18

Wirkung von Phosphonomycin zum Schutz von Mäusen, die durch bakterielle Mutanten-Isolate, welche hohe Werte des L- α -Glycerinphosphat-Transportsystems in Abwesenheit eines Induziermittels ergeben, infiziert wurden

Mutanten wurden aus E. coli 2017 unter Verwendung eines in Biochimica et Biophysica Acta, Band 60, Seite 422 bis 424, 1962, beschriebenen Mutagenese- und Mutantenbestimmungsgitters isoliert, und diese Mutanten zeigten hohe Werte an α -Glycerinphosphat und Glycerinstoffwechsel ohne die Notwendigkeit des vorherigen Wachstums in Anwesenheit dieser Induziermittel, wie sich beispielsweise bei den natürlichen Stämmen zeigt. Der Durchmesser der Inhibierungszonen rund um die Sensibilisierungsscheiben, welche 5 μ g Phosphonomycin aufweisen, die auf mit Mutanten C₁, C₂ und dem Ausgangsstamm beimpften Nähragarplatten aufgebracht waren, betrugen 20, 24 bzw. 12 mm. Da gezeigt wurde (Beispiel 1), dass die Zugabe von Glycerin zu diesen Scheiben auf dem Ausgangsstamm die Zonengrösse aus 26 bis 29 mm vergrösserte, ist daraus zu schliessen, dass die Mutantenstämme Ausmasse des Phosphonomycin-Transportsystems besitzen (d. h., das L- α -Glycerinphosphat-Transportsystem), die denen induzierter wilder Stämme vergleichbar sind. Daher sollte die Empfindlichkeit dieser Mutanten gegenüber der Phosphonomycin-Therapie aus der Empfindlichkeit induzierter wilder Stämme in anderen Situationen vorauszusagen sein. Mutanten C₁ und C₂ des Ausgangsstamms wurden unter identischen Bedin-

14127

43

gungen (in Beispiel 9 beschrieben) kultiviert und intraperitoneal in Mäuse bei den angegebenen Ansprechwerten eingepflegt. Mäuse wurden subkutan mit Phosphonomycin unmittelbar nach Infektion injiziert.

Bakterienstamm	Anzahl geimpfter Zellen (Virulenz)	ED ₅₀ (μ g Phosphonomycin)
E. coli 2017 (Ausgangsstamm)	$4,2 \times 10^6$ (10 LD ₅₀)	943
Mutante C ₁	$4,7 \times 10^6$ (30 LD ₅₀)	12
Mutante C ₂	$1,2 \times 10^7$ (9 LD ₅₀)	14

Selbst obgleich die Mutanten volle Virulenz besitzen, werden sie durch ein bemerkenswert niedriges Ausmass an Phosphonomycin bekämpft, was bedeutet, dass der nichtinduzierte wilde Stamm in vivo weit weniger entfaltet, als seine volle induzierbare Kapazität hinsichtlich der Ansprechbarkeit auf Phosphonomycin. Es ist daraus zu schliessen, dass es möglich ist, maximale Werte des L- α -Glycerinphosphat-Transportsystems herzustellen und eine entsprechend wirksamere Therapie durch Phosphonomycin in irgendeiner beliebigen klinischen Situation (z. B. Harntrakt- oder Hautinfektionen), wo die Abwesenheit von Glucose eine wirksame Induktion durch gleichzeitig verabreichte Potentierungsmittel (z. B. Glycerin), welche solche Stellen erreichen, sicherstellt.

14127

44

Beispiel 19

Wirkung von gleichzeitig verabreichtem Glucose-6-phosphat auf die Empfindlichkeit gegenüber Phosphonomycin, in vitro und in vivo einer bakteriellen Variante, die beim Menschen während der Therapie Resistenz gegenüber Phosphonomycin angenommen hatte

Die im folgenden verwendeten Stämme von *Escherichia coli* stellen im Fall von M 13 ein Isolat aus dem Urin eines infizierten weiblichen Tieres unmittelbar vor seiner Behandlung mit Phosphonomycin dar und im Fall von M 21 ein Isolat aus den arzneimittelresistenten Organismen, die in dem Urin dieses Lebewesens nach 7tägiger Therapie mit dem Antibiotikum vorliegen. Die in vitro durchgeführten Empfindlichkeitstests erfolgten in der in Beispiel 6 beschriebenen Weise. Der in vivo durchgeführte Mausschutzversuch erfolgte wie in Beispiel 9 beschrieben nach intraperitonealer Versetzung mit der angegebenen Anzahl an Organismen.

Empfindlichkeitstests in vitro

Inhibierungszonen (mm), welche die Scheiben umgeben, die 30 µg Phosphonomycin allein oder in Kombination mit 5 µg Glucose-6-phosphat enthalten

	Phosphonomycin allein	plus Glucose-6-phosphat
E. coli M 13	19	28
E. coli M 21	0 (weniger als 7 mm)	20

Heilwirkung von Phosphonomycin bei infizierten Mäusen
(ED₅₀ in mg)

	Phosphonomycin allein	Phosphonomycin gleich- zeitig mit 1 mg Di- natriumglucose-6- phosphat verabreicht
E. coli M 13 3,7 x 10 ⁷ Zellen = 8 LD ₅₀	0,25	0,035
E. coli M 21 1,2 x 10 ⁷ Zellen = 10 LD ₅₀	17,5*	2,5

* Bei dem höchsten an diese Gruppe verabreichten Arzneimittelwert, 20 mg je Maus, wurden nur 3 der fünf infizierten Tiere geschützt. In den anderen drei Gruppen wurde vollständiger Schutz bei nicht mehr als dem zweifachen, mittleren angegebenen Wert beobachtet.

Da der resistente Stamm die Fähigkeit, auf Phosphonomycin nach gleichzeitiger Zugabe von Glucose-6-phosphat anzusprechen, beibehält, wird gefolgert, dass der Hexose-6-phosphat-Transportweg nicht merklich durch endogene Substanzen bei den natürlichen Harninfektionen des Menschen induziert wird. Wenn Transport durch die absichtliche gleichzeitige Verabreichung von Induzierungsmitteln hervorgerufen wird, sollte die Resistenz gegenüber Phosphonomycin verhindert oder beseitigt sein, und die therapeutische Beseitigung derartiger Stämme würde ermöglicht werden.

Beispiel 20

Wirkung gleichzeitiger Verabreichung von Glucose-6-phosphat auf die Empfindlichkeit eines wilden, induzierbaren Bakterienstammes und einer davon abgeleiteten nichtinduzierbaren Mutante gegenüber Phosphonomycin in vitro und in vivo

Eine mit 2017 A bezeichnete Mutante, welche keine zusätzliche Empfindlichkeit in vitro gegenüber Phosphonomycin nach Zugabe von Glucose-6-phosphat ergibt, wurde aus seinem Ausgangsstamm, dem natürlich vorkommenden pathogenen *Escherichia coli* 2017 durch die in Beispiel 6 zur Isolierung des Stammes MB 2489 A2 aus seinem Ausgangsstamm MB 2489 beschriebenen Verfahren isoliert. Die Mutante 2017 A zeigte eine normale Fähigkeit, Glucose-6-phosphat umzuwandeln. Seine Empfindlichkeit in vitro gegenüber Phosphonomycin wurde in vivo in Bezug auf den Ausgangsstamm zweimal in den unten beschriebenen Mäuseschutzversuchen unter Verwendung des in Beispiel 9 aufgeführten Vorgehens bestimmt.

In vitro Empfindlichkeitstests

Inhibierungszonen (mm), welche die Scheiben umgeben, die 30 µg Phosphonomycin allein oder in Kombination mit 5 µg Dinatriumglucose-6-phosphat enthalten

	Phosphonomycin allein	plus Glucose-6-phosphat
<i>E. coli</i> 2017	18	27
<i>E. coli</i> 2017 A	17,5	18

14127

44

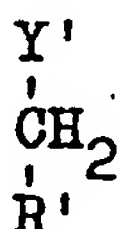
Heilwirkung von Phosphonomycin bei infizierten Mäusen
(ED₅₀ in mg)

	Phosphonomycin allein	Phosphonomycin gleichzeitig mit 1 mg Dinatriumglu- cose-6-phosphat verabreicht
<u>Versuch I</u>		
E. coli 2017		
1 x 10 ⁶ Zellen	0,230	0,015
= 9 LD ₅₀		
E. coli 2017 A		
1 x 10 ⁶ Zellen	0,166	0,284
= 7 LD ₅₀		
<u>Versuch II</u>		
E. coli 2017		
5 x 10 ⁶ Zellen	0,821	0,021
= 13 LD ₅₀		
E. coli 2017 A		
9 x 10 ⁶ Zellen	1,420	1,130
= 33 LD ₅₀		

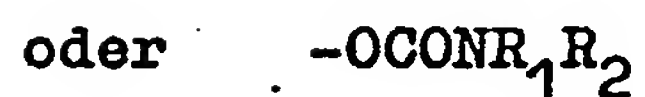
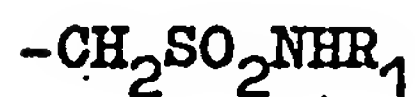
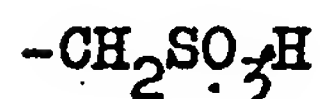
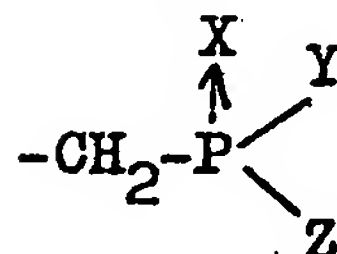
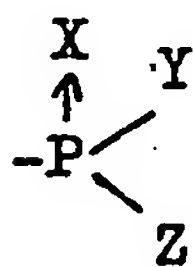
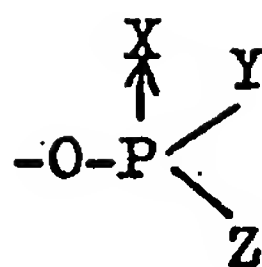
Der Unterschied der Mutante 2017 A gegenüber der Kombination von Glucose-6-phosphat mit Phosphonomycin in vitro wird in vivo durch das Versagen des gleichzeitig verabreichten Glucose-6-phosphats zur Steigerung der Wirksamkeit von Phosphonomycin bei der Behandlung von durch diese Mutante infizierten Mäusen wiedergegeben. Somit ist die normale Wirksammachung der Heilwirkung von Phosphonomycin durch Glucose-6-phosphat auf seine direkte Wirkung auf induzierbare infizierende Bakterienstämme zurückzuführen und nicht durch jede beliebige Ansprechbarkeit des Wirtes, die vermu-

tet werden könnte (z. B. erhöhte Arzneimittelabsorption oder immunes Ansprechen), wodurch die Mutante ebenso günstig beeinflusst würde wie der Ausgangsstamm. Die gleiche Wirksamkeit von Phosphonomycin allein gegenüber Infektionen auf Grund induzierbarer und nichtinduzierbarer Organismen deutet darauf hin, dass endogene Induziermittel entweder abwesend sind oder in einem zu geringen Ausmass vorliegen (in solchen Bereichen des Körpers, der durch Mikroorganismen befallen ist), um die Biosynthese des Hexose-6-phosphat-Transportsystems hervorzurufen. Die festgestellten Wirkungsvorteile, die sich aus der Induktion dieses Systems ergeben, erfordern ausdrücklich die Verabreichung exogener Induziermittel durch den Therapeuten.

Gemäss der Erfindung können die bakteriellen Transportsysteme in infizierten Tieren unter Verwendung geringer Dosierungen an wirksammachenden Mitteln, insbesondere auf oralem Wege herbeigeführt werden, wenn Spaltung der Esterbindung entweder durch bakterielle intestinale, Leber-, Nieren-, Plasma- oder Harnphosphatasen vermieden wird. Die bevorzugten wirksammachenden Mittel sind Kohlehydratester der Formel:



worin $-CH_2-$ die endständige Methylengruppe der Gruppierung $R'-CH_2-OH$, eine Pentose oder Hexose, wie beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, 2-Desoxy-glucose, 2-Amino-2-desoxyglucose, Galactose, Ribose, einen 1-substituierten Ribit, z. B. Riboflavin, oder Glycerin und Y' die folgenden Gruppierungen



bedeuten, worin X, Y, Z, R₁ und R₂ die vorstehend angegebene Bedeutung besitzen und deren Salze.

1. Oktober 1970

50

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Wirksammachung der Aktivität eines Phosphonomycin-Antibiotikums, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien mit einem Induziermittel in Berührung gebracht werden, welches unter Steigerung eines bestehenden Weges oder unter Erschliessung eines neuen Transportweges für die Bakterien wirkt und die Bakterien später oder gleichzeitig mit einem Phosphonomycin-Antibiotikum in Berührung gebracht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Induziermittel verwendet wird, das ein Hexosephosphat-Transportsystem herbeiführen kann.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Induziermittel verwendet wird, das ein Glucose-6-phosphat-Transportsystem herbeiführen kann.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel ein Zuckerphosphat verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel ein Phosphatid verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Induziermittel verwendet wird, das das α -Glycerinphosphat-System steigern kann.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel ein mehrwertiger Alkohol verwendet wird.

14127.

-51-

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Glucose-6-phosphat verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Mannose-6-phosphat verwendet wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Glucose-1-phosphat verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Ribose-5-phosphat verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Galactose-6-phosphat verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Induziermittel Lactose verwendet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Phosphonomycin-Antibiotikum ein Salz des Phosphonomycins verwendet wird.
15. Verfahren zur Ermittlung von Induziermitteln für den Eintritt eines Phosphonomycin-Antibiotikum-Transportsystems in Bakterien, dadurch gekennzeichnet, dass eine phosphonomycinresistente Mutante in einem Medium gezüchtet wird, das ein Phosphonomycin-Antibiotikum und eine Testverbindung enthält und solche Verbin-

dungen als Induziermittel gewählt werden, welche das Wachstum der Mutante inhibieren.

16. Verfahren zur Wirksammachung der Aktivität eines Phosphonomycin-Antibiotikums bei der antibiotischen Therapie, dadurch gekennzeichnet, dass ein Induziermittel eines Phosphonomycin-Transportweges in das infizierte Bakterium vor oder gleichzeitig mit dem Phosphonomycin-Antibiotikum verabreicht wird.
17. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Induziermittel gleichzeitig mit dem Phosphonomycin-Antibiotikum durch parenterale Verabreichung verabreicht wird.
18. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Induziermittel parenteral und das Phosphonomycin-Antibiotikum oral verabreicht werden.
19. Antibiotische Zusammensetzung, gekennzeichnet durch ein Phosphonomycin-Antibiotikum, ein Induziermittel eines Phosphonomycin-Transportsystems in Bakterien und einen pharmazeutisch-annehmbaren Träger.

ORIGINAL INSPECTED

PATENT SPECIFICATION

(11) 1311956

1311956

NO DRAWINGS

- (21) Application No. 46063/70 (22) Filed 28 Sept. 1970
 (31) Convention Application No. 863 351 (32) Filed 2 Oct. 1969
 (31) Convention Application No. 71247 (32) Filed 11 Sept. 1970 in
 (33) United States of America (US)
 (44) Complete Specification published 28 March 1973
 (51) International Classification A61K 21/00, 27/00
 (52) Index at acceptance
 A5B 216 21Y 230 23Y 281 28Y 30X 30Y 314 31Y
 325 32Y 38Y 390 402 40Y
 (72) Inventors FREDERICK MARVIN KAHAN and PATRICK
 JOSEPH CASSIDY



(54) METHOD OF POTENTIATING THE ACTIVITY OF PHOSPHONOMYCIN ANTIBIOTICS

(71) We, MERCK & CO. INC., a corporation duly organised and existing under the laws of the State of New Jersey, United States of America, of Rahway, New Jersey, United States of America, do hereby declare the invention for which we pray that a patent may be granted to us, and the method by which it is to be performed to be particularly described in and by the following statement:—

The elimination of bacterial infections by antibiotic therapy is often thwarted by practical difficulties for achieving sufficiently high levels of the antibiotic at the site of infection. In cases where only marginally effective concentrations are used, antibiotic-resistant organisms frequently emerge from the original infecting population. This problem is important in the case of the new antibiotic phosphonomycin [(−) (cis - 1,2 - epoxypropyl) phosphonic acid] since it is excreted rapidly and its action is antagonized by common constituents of plasma and urine such as glucose and phosphate, respectively. In addition, the antibiotic is occasionally found to be ineffective against pre-existent mutants which are relatively resistant to this antibiotic and occur within many bacterial populations. Accordingly, methods of overcoming these difficulties in antibiotic therapy have been sought.

This present invention is based on the discovery that the activity of phosphonomycin antibiotics as herein defined in greatly potentiated by certain inducers that act to improve certain transport pathways in bacteria.

In accordance with the present invention the antibacterial activity of a phosphonomycin antibiotic in a non-human animal is potentiated by bringing bacteria into contact with an inducer selected from phosphatides, sugar phosphates and salts thereof, and polyhydric

alcohols, whereby an existing phosphonomycin transport pathway in the bacteria is enhanced or a new such pathway is brought into being, and subsequently or simultaneously bringing the bacteria into contact with a phosphonomycin antibiotic.

This present invention also provides an antibiotic composition comprising a phosphonomycin antibiotic as herein defined, an inducer of a phosphonomycin transport system in bacteria, selected from phosphatides, sugar phosphates and salts thereof, and polyhydric alcohols, and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or vehicle.

Thus, compounds enhancing the activity of the α -glycerophosphate transport system, or evoking *de novo* a hexose-phosphate system in bacteria can be used either prior to or concomitantly with a phosphonomycin antibiotic to potentiate its activity, thereby permitting therapy at tissue levels obtainable by reasonable dosage. For example, microorganisms that exhibit no evidence of sensitivity to a particular antibiotic either because of the absence of a transport pathway or the presence of only low levels of suitable transport pathways are rendered sensitive to the antibiotic by exposure to an inducer of the type defined above to provide a suitable pathway or an enhancement of the existing pathway. In those cases where less than the maximal rate of synthesis of the susceptible transport system occurs prior to the introduction of the inducer to the medium, the inducer is said to enhance the rate of their synthesis and thus enhance the activity per cell of the transport system. In those cases where the rate of synthesis of a particular class is virtually zero in the absence of inducers, the latter introduce a new transport pathway into being. The inducer is frequently a substrate for one of the group of proteins it enhances or evokes.

By virtue of the activity of the inducers used in accordance with this present invention, organisms stimulated by them accumulate higher levels of phosphonomycin and are thus killed by relatively small doses of the antibiotic. Organisms that show no evidence of sensitivity toward phosphonomycin, either because the α -glycerophosphate system is present at only low levels or is absent altogether as a result of mutation to phosphonomycin resistance, are rendered sensitive to this antibiotic by the evocation of the hexose-phosphate transport pathway. Thus sensitivity is conferred on bacteria populations that are otherwise untreatable, either through prior acquisition of resistance to the antibiotic or through intrinsic insensitivity to the antibiotic.

Another advantage that may result from the present invention is that if two or more independent transport systems are inducible in a microorganism, the incidence of antibiotic resistance is much lower, since the simultaneous loss by mutation of two pathways is rare in microorganisms.

It should be emphasized that the inducers described herein are not antibiotics or antimetabolites but that they stimulate the biosynthesis of natural nutrient transport mechanisms that mediate the entry into the cell of the phosphonomycin antibiotic. This phenomenon applies uniquely to the phosphonomycin antibiotics since it has been observed that bacterial strains thus induced show no increase in sensitivity to other antibiotics tested. An important advantageous consequence of using the compounds serving as inducers is that the inducer need not be present when the transport systems mediate the entry of antibiotic into the bacterium. Thus, inducers that might compete with the phosphonomycin antibiotic for the transport proteins when simultaneously present with it and thus impair the transport pathway may be added well prior to the administration of the antibiotic and be given opportunity to dissipate within the host. In addition, the present invention does not require that the blood levels and excretion rate of two or more components be matched with each other, which is normally the case when two antibiotics are coadministered to give a synergistic effect. Therefore, the difficulty encountered in the past of establishing potent levels of two different synergizing drugs does not arise in the present invention since the inducers used need only to induce the transport pathway and then disappear; the transport proteins produced remain and thereby provide a means of entry of antibiotic into the bacteria cell. Sugar phosphates that are preferred for use in the methods and compositions of the present invention include glucose - 6 - phosphate, fructose - 6 - phosphate, mannose - 6 - phosphate, glucose - 1 - phosphate, 2 - deoxy - glucose - 6 - phosphate, 2 - amino - 2 - deoxy - glucose - 6 - phosphate,

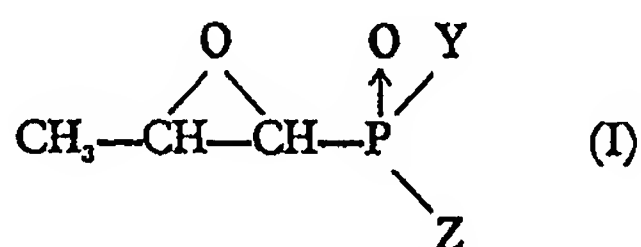
glucose - 1,6 - diphosphate, galactose - 6 - phosphate and ribose - 5 - phosphate. Thus, when susceptible bacteria are contacted with these sugar phosphates either prior to or concomitantly with a phosphonomycin antibiotic, such phosphates or an active metabolite derived therefrom potentiate the activity of the antibiotic, and it is then possible to use much smaller amounts of the antibiotic than would otherwise be necessary to control the pathogen. This observed co-action in inducing a hexose - 6 - phosphate transport system to potentiate the effectiveness of the phosphonomycin antibiotic is indeed remarkable and entirely unexpected. For example, in tests in mice against *E. coli* it is found that using a combination of glucose - 6 - phosphate and the antibiotic, the dose of phosphonomycin antibiotic needed to protect one-half the mice is less than one-tenth that required of antibiotic alone.

The coaction of the inducers described herein and the phosphonomycin antibiotic provide a valuable means for controlling and eliminating bacteria which are otherwise resistant to the action of a phosphonomycin antibiotic. Thus in accordance with the present invention a combination of the induced and the antibiotic in a suitable vehicle can be prepared by well known procedures, and used topically for the treatment of infections. Alternatively and in accordance with another embodiment of the present invention, the inducer and the antibiotic can be administered parenterally or orally to an infected non-human animal host either separately or in combination in a suitable pharmaceutical carrier, or one can be administered parenterally and the second can be given orally.

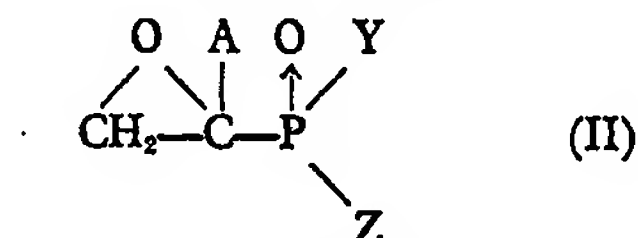
The pharmaceutical forms of the antibiotic and/or the inducing compounds, which constitute another aspect of the present invention, can be prepared in accordance with well known procedures using suitable pharmaceutical solid or liquid diluents. The compositions can be in the form of tablets, powders, granules, capsules, suspensions, solutions, elixirs, syrups or other dosage forms particularly suitable for oral administration. It can also be in the form of sterilized solutions or suspensions for parenteral administration. In such products the sterile vehicle can be a sterile solution or suspension. The compositions containing the antibiotic can be admixed with solid diluents and/or tableting adjuvants such as corn starch, talc, stearic acid, magnesium stearate and gums. The usual encapsulating or tableting materials useful in preparing pharmaceutical products can be used so long as they are not incompatible with the antibiotic or the inducing compounds. These dosage forms can contain from 25 to 500 mg of the active substances and can be administered in doses given 1 to 6 times per day depending upon the patient's age and

condition, the infection and the mode of administration.

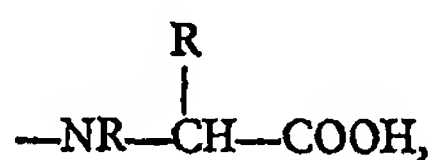
The term "phosphonomycin antibiotic" as used herein includes phosphonomycin and its derivatives of the formula:



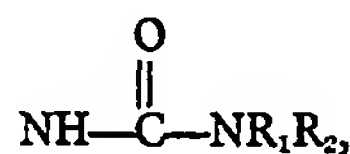
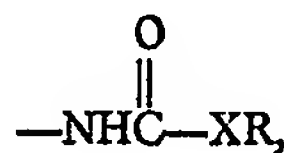
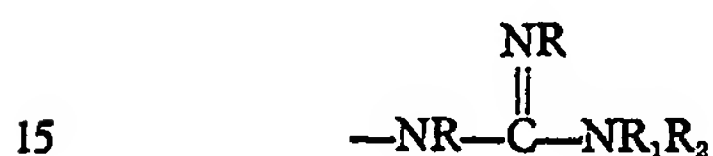
and the corresponding analogues of the formula:



where A represents hydrogen of C_{1-6} alkyl, and each of Y and Z, which are the same or different represents OH, OR, $-\text{NR}_1\text{R}_2$,



$-\text{NROR}$, $-\text{NRNR}_1\text{R}_2$, $-\text{NR}-\text{N}=\text{CR}_1\text{R}_2$,



$-\text{N}=\text{C}=\text{X}$, or $-\text{N}_3$, where R is hydrogen or a univalent substituted or unsubstituted hydrocarbon group and each of R_1 and R_2 represents hydrogen, acyl, or a univalent substituted or unsubstituted hydrocarbon group, the substituents in the substituted hydrocarbon groups in the definitions of R, R_1 and R_2 being amino, nitro, halo or oxygen-containing substituents. Also included in formulae I and II are the inorganic and organic salts of those compounds in which Y and/or Z is $-\text{OH}$, and the cyclic derivatives in which Y and Z are connected via a residue of a polyfunctional hydrocarbon compound such as a straight or branched-chain alkylene, aralkylene, arylene polyamine, or aminoalcohol, such as ethylenediamine, monoethanolamine, phenylenediamine, naphthalenediamine or *o*-aminophenol, and those cyclic derivatives in which $-\text{NR}_1\text{R}_2$ represents the residue of a cyclic primary or secondary amine, for example, morpholine, piperidine or pyrrolidine.

Where R , R_1 or R_2 in formulae I and II represent a univalent substituted or unsub-

stituted hydrocarbon radical, it can be aliphatic, cycloaliphatic, araliphatic or aromatic and can, if desired, be further substituted. When aliphatic, it can be substituted or unsubstituted alkyl, alkenyl or alkynyl. R , R_1 and R_2 can also be aralkyl or substituted aralkyl such as benzyl, phenethyl, phenylpropyl, *p*-halobenzyl or *o*-, *m*- or *p*-alkoxybenzyl, nitrobenzyl, aminophenethyl, pyridylethyl, nitrofurylmethyl or thienylpropyl, and aryl or substituted aryl, such as phenyl, naphthyl or substituted phenyl.

Thus, in accordance with the foregoing, the amide group or groups can be derived from compounds that are themselves antibacterial. Examples of such compounds that might be mentioned are 6-aminopenicillanic acid, 7-aminocephalosporanic acid, sulfa compounds such as sulfanilamide, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadimetine, sulfapyridine, sulfathiazole, sulfisoxazole, thiodiazole, sulfacetamide, sulfaguanidine, sulfaquinoxaline, and *p*-aminophenylsulfonamide, and *p*-aminobenzenesulfonic acid, and antibiotic agents such as ampicillin, streptomycin, dihydrostreptomycin, cycloserine, cephaloglycin and cephalixin.

The compounds of formulae I and II where at least one of Y and Z is $-\text{OH}$ will form organic and inorganic salts, which constitute a preferred aspect of the invention because they are more stable than the free acid. Examples of such salts are inorganic metallic salts such as the sodium, aluminium, potassium, ammonium, calcium, magnesium, silver and iron salts. Organic salts that may be mentioned as representative include the salts with primary, secondary or tertiary amines such as monoalkylamines, dialkylamines, trialkylamines and nitrogen-containing heterocyclic amines. Representative examples are salts with amines such as α -phenethylamine, diethylamine, quinine, brucine, lysine, protamine, arginine, procaine, ethanolamine, morphine, benzylamine, ethylenediamine, $\text{N,N}'$ -dibenzylethylenediamine, diethanolamine, piperazine, dimethylaminoethanol, 2-amino-2-methyl-1-propanol, theophylline, esters of amino acids, and *N*-methylglucamine. If desired, the basic residue of the salt may be a biologically active amine such as erythromycin, oleandomycin or novobiocin.

The monoamide-monoester derivatives and particularly those compounds having a labile ester substituent are especially valuable derivatives. By the term "labile ester" is meant a group which is readily hydrolyzed biologically, for example by enzymes in the body fluids of animals including man, to produce the free acid or a salt thereof which is more active as an antibiotic agent. The amide or substituted amide groups present in the amide-ester derivatives are also readily hydrolysed biologically in the body fluids and hence the

amide-labile ester derivatives are useful in antibiotic therapy.

- 5 Suitable labile ester groups include ethers of the formula $-\text{CH}_2\text{OR}$, a phenacyloxy-methyl group, acyloxy methyl groups of the formula $-\text{CH}_2\text{OA}$ where A is an acyl group comprising an organic radical derived from an organic acid by the removal of the hydroxy group, amide and substituted amide derivatives of such acyloxymethyl substituents, acylamino-
- 10 methyl groups of the formula $-\text{CH}_2\text{NHA}$ where A is the same as defined above, thio-methyl ethers of the formula $-\text{CH}_2\text{SR}$, an ethynyloxy group of the formula
- 15 $-\text{CH}_2\text{OC}\equiv\text{CH}$, substituted ethynyloxy groups of the formula $-\text{CH}_2\text{OC}\equiv\text{CR}$, a vinyloxymethyl group of the formula $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CH}_2$, substituted vinyloxy-
- 20 methyl groups of the formulae $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CHR}$ or $-\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CRR}$, or a nitro oxy group of the formula $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$. R in each of the foregoing formulae is a univalent substituted or unsubstituted hydrocarbon group.

- 25 Specific examples of such labile ester groups that might be mentioned are methoxymethyl, tetrahydropyranyloxymethyl, phenacyloxy-methyl, acetoxymethyl, butyryloxymethyl, iso-
- 30 butyryloxymethyl, pivaloyloxymethyl, benzoyloxymethyl, 2 - methylbenzoyloxymethyl, 2,6 - dimethylbenzoyloxymethyl, 2 - methyl - 6 - chlorobenzoyloxymethyl, 3 - trifluoromethyl-
- benzoyloxymethyl, 2 - nitrobenzoyloxymethyl, 2 - methylthiobenzoyloxymethyl, 2 - thienyl-

carbonyloxymethyl, 2 - furylcarbonyloxy-methyl, 3 - pyridylcarbonyloxymethyl, pyr-
 azinylcarbonyloxymethyl, 2 - methylcyclo-
 pentylcarbonyloxymethyl, 1 - adamantyl-
 carbonyloxymethyl, phenylsulfonylmethyl,
 phosphonooxymethyl, diethylphosphonoxymethyl, carbethoxyoxymethyl, carbamoyloxy-
 methyl, N - methylcarbamoyloxymethyl, N,N -
 dimethylcarbamoyloxymethyl, phenylsulf-
 amoyloxymethyl, acetaminomethyl, benzoyl-
 aminomethyl, methylthiomethyl, phenylthio-
 methyl, vinyloxymethyl, 1 - methylvinyloxy-
 methyl, and nitrooxymethyl.

The following examples illustrate embodi-
 ments of the invention. 'Difco' and 'Dowex'
 are trademarks.

Example 1

Effect of Combining Glycerol or DL- α -
 Glycerophosphate with Phosphonomycin on
 its Inhibition of Several Strains of Bacteria

Overnight cultures of the indicated strains in
 Nutrient Broth (Difco) were diluted one
 hundred fold, and 0.05 ml. portion was
 swabbed over the surface of a 2mm-deep
 layer of the indicated solid growth media in
 50cm² petri dishes. Sensitivity discs, consisting
 of a 7mm-diameter filter-paper circle contain-
 ing either 5 or 30 μg of phosphonomycin with
 an additional amount of glycerol or disodium
 DL- α -glycerophosphate were placed on the
 surface of the seeded agar. Zones of inhibition
 were measured after 18 hours of incubation
 at 37°C. The results are shown in the follow-
 ing table:

Strain	Medium	$\mu\text{g P}$	Zone Size mm Diameter				
			P	A	B	C	D
<i>E. coli</i> MB 2489	Nutrient Agar	5	11	45	40	10	0
<i>E. coli</i> MB 2498	Nutrient Agar	30	13	13	12	13	0
<i>E. coli</i> MB 2489 A2	Nutrient Agar	5	8	47	43	10	0
<i>E. coli</i> MB 2017	Nutrient Agar	5	12	29	26	16	0
<i>Pseudo.</i> <i>aeruginosa</i> T 9	Nutrient Agar	5	15	40	18	15	0
<i>Pseudo.</i> <i>aeruginosa</i> T 19	Nutrient Agar	30	18	31	29	16	0
<i>Pr. mirabilis</i> T 10	Mueller Hinton Agar	5	21	25	23	23	23
<i>D. pneumoniae</i> I 37	Nutrient Agar + 10% Horse serum	30	10	15	—	16	—
<i>D. pneumoniae</i> I 37	Brain Heart Infusion + 10% Horse serum	30	12	14	—	15	—
<i>D. pneumoniae</i> I 2483	Brain Heart Infusion + 10%	30	10	13	—	14	—
<i>Strep. pyogenes</i> 3009	Horse serum Brain Heart Infusion + 10% Horse serum	30	15	19	—	18	0
<i>Strep. pyogenes</i> 1685	Brain Heart Infusion + 10% Horse serum	30	14	17	—	13	0
<i>Sal. schott-</i> <i>muelleri</i> 1814	Brain Heart Infusion	30	11	19	—	12	—
<i>Sal. typhi-</i> <i>murium</i> MB 1995	Brain Heart Infusion	30	15	19	—	15	—
<i>Sal. typhosa.</i> 2866	Brain Heart Infusion	30	19	22	—	19	—

Key to identity and amount of potentiator added to disc in combination with phosphonomycin;

P — Phosphonomycin (disodium salt) (amount indicated in the column to the left).

A — Glycerol, 10 mg.

B — Glycerol, 1 mg.

C — DL- α -glycerophosphate, disodium, 10 μg .

D — DL- α -glycerophosphate, disodium, 100 μg .

Glycerol is seen to affect a broad spectrum of strains, failing only in the case of *E. coli* 2498 (a mutant derivative of MB 2489) which is known to lack α -glycerophosphate transport activity, and *Proteus mirabilis* (T 10). The latter strain, in common with all sensitive *Proteus* species examined, has a very active α -glycerophosphate transport system, which is in all probability not subject to enhancement by inducers.

Few significant examples of enhanced sensitivity are observed at the low level of added disodium *DL*- α -glycerophosphate, even though it is a known inducer of the transport system at least in MB 2489. Rather, antagonism is demonstrable at the high level (100 μ g) added to the disc. This phenomenon probably represents the expected competition between phosphonomycin and α -glycerophosphate for

their common transport system. In contrast, glycerol, while an *inducer*, is not a *substrate*, and therefore does not preoccupy the transport system whose activity it has stimulated.

Example 2

The Effect of Glucose-6-Phosphate on the Sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to Phosphonomycin in Liquid Media of Various Composition

Overnight broth cultures were diluted 1:10,000 (10^7 cells/ml) in the indicated media and combined with an equal volume of media containing various levels of disodium phosphonomycin. The minimal inhibitory concentration (M.I.C.) was that final concentration of phosphonomycin below which turbidity was observed following a 24-hour incubation at 35°C.

Medium	M.I.C. μ g/ml <i>Staphylococcus aureus</i> MB 2949	Phosphonomycin <i>Escherichia coli</i> MB 2017
Mueller Hinton Broth (Difco)	50	3.12
Mueller Hinton Broth plus disodium glucose-6-phosphate, 25 μ g/ml	3.12	0.78
Nutrient Broth (Difco)	25	12.5
Nutrient Broth (Difco) plus disodium glucose-6-phosphate	1.5	0.39
Nutrient Broth (Difco) plus 5% v/v Defibrinated Sheep Blood (Gibco)	3.12	0.39

With both media, glucose-6-phosphate is observed to potentiate by a factor of 4 to 40 the sensitivity of Gram-positive and Gram-negative pathogens. In Nutrient Broth, the effect observed with glucose-6-phosphate mimics that observed with sheep blood.

Example 3

The Influence of Glucose-6-Phosphate on the Fraction of Bacterial populations that Survive a Given Level of Phosphonomycin

Various dilutions of overnight broth cultures of the indicated bacterial strains were swabbed

over the surface of petri dishes containing Mueller Hinton medium, 1.5% Agar (Difco), and supplemented with the indicated levels of disodium phosphonomycin, with or without 25 μ g/ml of disodium glucose-6-phosphate. From the number of colonies present at a particular dilution of input organisms, the number of input cells surviving a given level of phosphonomycin with and without glucose-6-phosphate are calculated and shown in the following table:

Strain	µg/ml Phosphono- mycin	Number of surviving colony formers per ml	
		Mueller Hinton Agar alone	Mueller Hinton Agar plus 25 µg/ml glucose-6- phosphate
<i>Escherichia coli</i> MB 2017	0	3×10^9	3×10^9
	10	3×10^6	5×10^3
	30	3×10^5	50
	100	3×10^5	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> MB 2949	0	3×10^9	3×10^9
	10	3×10^5	3×10^5
	30	3×10^5	<100
	100	3×10^3	<10
<i>Aerobacter aerogenes</i> MB 3287	0	7×10^8	5×10^8
	10	3×10^7	1×10^5
	30	5×10^5	5×10^4
	100	3×10^5	5×10^2
<i>Staphylococcus aureus</i> MB 3036	0	2×10^8	2×10^8
	10	2×10^5	1×10^3
	30	2×10^4	1×10^3
	100	<10	<10
<i>Shigella sp.</i> MB 3298	0	2×10^8	2×10^8
	10	3×10^7	1×10^3
	30	3×10^7	1×10^3
	100	1×10^4	6×10^2

5 In all cases, a smaller proportion of the
10 input bacterial population survives to form colonies on the plate containing glucose-6-phosphates than on the plate that lacks this
15 potentiation. In most cases, the substantial
20 residual population (of the order of 1 in
25 10^3 to 1 in 10^4) that survive high levels
30 of phosphonomycin are eradicated or much
reduced when glucose-6-phosphate is also pre-
sent. Thus a sensitization of the bulk popula-
tion and an elimination of resisters are evident
when this inducer is present.

Example 4
Effect of Glucose-6-Phosphate on the Size of the Zone of Inhibition Surrounding
Discs Containing this Sugar Phosphate in
Combination with Phosphonomycin
Overnight cultures of the indicated strains
grown in Nutrient Broth (Difco) were diluted
one hundred fold, and a 0.05-ml portion was
swabbed over the surface of a petri dish con-
taining 10 ml of Mueller Hinton Agar (Difco).
Sensitivity discs, consisting of a 7 mm dia-
meter filter-paper disc containing either 5 or
30 µg of disodium phosphonomycin with or
without an additional 5 µg of disodium
glucose-6-phosphate, were placed on the sur-
face of the seeded agar. Zones of inhibition
were measured after 18 hours of incubation at
37°C.

Bacterial strain	Diameter of Zone of Inhibition mm			
	5 μ g — 30 μ g Phosphonomycin without glucose- 6-phosphate		5 μ g — 30 μ g Phosphonomycin plus glucose-6- phosphate .	
<i>Escherichia coli</i> MB 2017	11	16	20	24
<i>Staphylococcus aureus</i> MB 2949	0	11	13	20
<i>Aerobacter aerogenes</i> MB 3287	0	0	16	26
<i>Staphylococcus aureus</i> MB 3036	0	30	27	40
<i>Shigella sp.</i> MB 3298	0	10	24	37

5 The sensitization of cells by glucose-6-phosphate noted in the prior example is here made evident by substantial increases in the zone of inhibition surrounding discs that contain a mixture of phosphonomycin and glucose-6-phosphate. It is further noteworthy that in all cases where zone enhancement is observed in the presence of glucose-6-phosphate, the inhibited area is found to be relatively free of the myriad of drug resistant colonies that surround a disc of phosphonomycin by itself. These observations are consistent with the induction by glucose-6-phosphate of an alternate pathway for the entry of phosphonomycin into cells that have lost their normally expressed α -glycerophosphate transport pathway.

Example 5

20 Example of a Method for Screening Phosphate Esters as Inducers of Latent Transport Systems of Phosphonomycin in *Escherichia coli*
The strain of *Escherichia coli* MB 2498 is a subculture of mutant 6 described in Table

1 of the Journal of Molecular Biology, 31, 371 (1968). It lacks the ability to grow on or accumulate *L*- α -glycerophosphate, and is resistant to levels of phosphonomycin up to 70 μ g/ml in Nutrient Broth. (The parent wild type strain is completely inhibited by 10 μ g/ml of disodium phosphonomycin.) MB 2498 is also lacking in alkaline phosphatase activity, and therefore degrades exogenous phosphate esters to a minimum extent.

In a search for inducers of additional transport systems for phosphonomycin, 0.05 ml of a 10^7 cell/ml suspension was smeared over the surface of a 50 cm² petri plate containing 10 ml Nutrient Broth, 1.5% Agar (Difco), and 25 μ g/ml of disodium phosphonomycin. Paper discs measuring 7 mm in diameter and capable of absorbing 0.25 ml of solvent were treated with solutions of various phosphate esters and applied to the agar surface. Zones of inhibition were measured after 18 hours incubation at 37°C.

Compound tested	μg present in disc	Zone of inhibition mm diameter
None	—	0
Glucose-6-phosphate disodium	1.0 0.5 0.1	31 27 18
Fructose-6-phosphate disodium	10.0	42
Mannose-6-phosphate disodium	6.0	31
2-deoxy-glucose-6-phosphate disodium	1.0	27
2-amino-2-deoxy-glucose-6-phosphate disodium	25.0	34
Ribose-5-phosphate disodium, monohydrate	25	35
Phosphatidyl ethanolamine	30	29
Glucose-1',6'-diphosphate, tetrapotassium pentahydrate	25	34
Glucose-1-phosphate disodium	25	31
5-phosphoryl ribose-1-pyrophosphate, dimagnesium dihydrate	25	25
Riboflavin-5-phosphate disodium	25	14

Among the compounds in the above test showing no activity at a level of 25 μg per disc were: inositolphosphate, adenosine - 5' - phosphate, galactose - 1 - phosphate, 2'-deoxy ribose - 1' - phosphate, α - D - ribose - 1 - phosphate, β - D - ribose - 1 - phosphate, α - D - xylopyranose - 1 - phosphate, gluconic-6 - phosphate, mannose - 1 - phosphate, erythrose - 4 - phosphate, pyridoxine - phosphate, thiamine monophosphate, D - galactose - 6 - phosphate, D - fructose - 1 - phosphate, fructose - 1 - 6 - diphosphate, phosphoserine, phosphatidyl choline and N,N - dimethyl - L - phosphatidyl ethanolamine, as well as an extensive list of non-phosphorylated tetroses, pentoses, and hexoses. Thus the potentiation phenomenon shows a degree of specificity, which in the case of the hexose phosphates seems to include primarily those compounds that are generated by the hexokinases and includes those hexose phosphates known to induce the glucose - 6 - phosphate

transport system (Compounds 1, 2, 3, 4, and 9).

None of the potentiating compounds at the levels tested produced zones of inhibition with MB 2498 seeded plates consisting of Nutrient Broth/Agar lacking MK 955.

Example 6

Effect of Combining Various Phosphate Esters on the Inhibition of Several Strains of Bacteria

Overnight cultures of the indicated strains in Nutrient Broth (Difco) were diluted one hundred fold, and a 0.05-ml portion was swabbed over the surface of a 2 mm deep layer of the indicated solid growth media. Sensitivity discs, consisting of a 7-mm-diameter filter-paper circular disc containing either 5 or 30 μg of disodium phosphonomycin with an additional amount of the indicated phosphate esters, were placed on the surface of the seeded agar. Zones of inhibition were measured after 18 hours of incubation at 37°C.

25

30

35

40

45

Strain	P μg	Zone size mm diameter (see key below for phosphate ester added)									
		P	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MB 2489	5	11	25	25	20	30	22	21	18	15	22
MB 2489 A2	5	8	10	10	10	10	21	10	11	10	10
MB 2498	30	13	33	33	26	24	21	31	26	21	30
MB 24980	30	11	12	10	10	12	14	10	11	11	12
MB 2017	5	12	23	22	20	17	16	21	19	17	19
T 14	5	0	13	15	0	0	0	12	0	0	0
T 27	30	0	20	20	0	0	01	18	13	0	14
T 9	5	15	16	15	15	15	12	15	16	16	16
T 10	5	21	23	23	23	23	22	22	22	23	23
T 19	30	18	17	17	17	15	18	15	17	17	15

Key to the identity and amount of phosphate esters added to disc together with phosphonomycin.

P — Phosphonomycin disodium salt (amount indicated for the column to the left).

A — glucose-6-phosphate 5 μg.

B — 2'-deoxy-glucose-6-phosphate 5 μg.

C — ribose-5-phosphate 25 μg.

D — phosphatidyl ethanolamine 25 μg.

E — riboflavin-5-phosphate 50 μg.

F — fructose-6-phosphate 5 μg.

G — mannose-6-phosphate 5 μg.

H — 2-amino-2-deoxy-glucose-6-phosphate 25 μg.

I — glucose-1-phosphate 25 μg.

- 5 Strain MB 2489 is an *Escherichia coli* that grows well on α-glycerophosphate and D-glucose-6-phosphate. It exhibits on Nutrient Broth Agar moderate sensitivity to phosphonomycin that is much enhanced by the whole series of hexose-phosphate esters (A, B, F, G, I) that have been found capable of inducing glucose-6-phosphate transport pathway.
- 10 Strain MB 2489 A2 was isolated from the periphery of the enhanced zone of inhibition surrounding a disc bearing phosphonomycin (5 μg) and glucose-6-phosphate (25 μg). It was found to grow well on α-glycerophosphate,
- 15 but to show no stimulation of growth by glucose-6-phosphate. Although this strain is as sensitive to phosphonomycin alone as is the

parent MB2489 (as expected, since its α-glycerophosphate transport system is active), it fails to be stimulated on Nutrient Broth Agar by any of the hexose phosphate inducers of the glucose-6-phosphate transport system. In addition, the failure of ribose-5-phosphate and phosphatidyl ethanolamine to synergise suggests that these esters also induce the glucose-6-phosphate transport system. However, the activity still exhibited by riboflavin-5-phosphate implies the presence of yet a third inducible pathway that mediates enhanced phosphonomycin transport.

Strain MB 2498 is a mutant of MB 2489 that lacks the α-glycerophosphate pathway (i.e. it fails to grow on α-glycerophosphate but

retains the glucose-6-phosphate inducible system). Although it is much less sensitive on Nutrient Broth Agar to phosphonomycin as such than MB 2489, it retains the ability to be stimulated by the phosphate ester inducers.

5

Strain MB 24980 was isolated as a resistant colony from a plate containing 25 µg/ml of phosphonomycin and 25 µg/ml of glucose-6-phosphate. In keeping with the above results, its sensitivity on Nutrient Broth Agar to phosphonomycin is enhanced solely by riboflavin-5-phosphate.

10

Strain MB 2017 is an *Escherichia coli* pathogenic for mice. It exhibits broad sensitization on Nutrient Broth Agar by the entire class of phosphate ester inducers.

15

Strain T 14 is a *Klebsiella* species isolated from the urine of a patient just about to receive phosphonomycin therapy; T 27 is a *Klebsiella* species isolated from the urine of a patient who had been on phosphonomycin oral therapy for seven days. Both of the strains are resistant on Nutrient Broth Agar to phosphonomycin by itself, but show moderate sensitivity in the presence of a variety of inducers of the glucose-6-phosphate pathway.

20

Strains T 9 and T 19 are strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the urine of infected humans. They show no significant response on Nutrient Broth Agar to the above phosphate esters.

25

Strain T 10 is a *Proteus mirabilis* strain isolated from the urine of an infected human, and shows no significant response on Mueller Hinton Agar to any of the above phosphate esters.

30

Example 7

35

The Effect seen in Various Growth Media of Glucose-6-Phosphate on the Size of the Zone of Inhibition Surrounding Sensitivity Discs Containing this Sugar Phosphate in Combination with Phosphonomycin

40

An overnight culture of *Escherichia coli*, MB 2489, grown in Nutrient Broth was diluted one hundred fold, and an aliquot of 0.05 ml was swabbed over the surface of a 2 mm deep agar medium consisting of either Nutrient Broth, 1.5% Agar (Difco), Brain Heart Infusion, 1.5% Agar (Difco), Mueller Hinton Agar (Difco), Trypticase-Soy Agar (BBL), or a "human urine-agar." The latter medium was prepared by centrifuging adult male urine collected immediately after sleep, membrane filtering the supernatant to achieve sterility and combining the filtrate with one tenth volume of autoclaved 15% Noble Agar (Difco) in water to produce a solid medium. Sensitivity discs, consisting of a 7mm diameter filter paper disc containing either 5 or 30 µg of disodium phosphonomycin with and without disodium glucose-6-phosphate, were placed on the surface of the seeded agar. Zones of inhibition were measured after 18 hours of incubation at 37°C.

45

50

55

60

Medium used	Diameter of Zone of Inhibition — mm			
	5 µg	30 µg	5 µg	30 µg
	Phosphonomycin alone		Phosphonomycin plus glucose-6-phosphate (25 µg)	
Nutrient Broth	12	24	28	33
Mueller Hinton Broth	0	14	20	26
Brain Heart Infusion	0	12	16	20
Trypticase-Soy Broth	0	15	18	24
Human urine	9	19	14	26

70

The activity of phosphonomycin alone is clearly antagonized relative to Nutrient Broth in the other media employed. This antagonism can be attributed to a major extent to high levels of sodium chloride in Mueller Hinton, glucose and phosphate in Brain Heart Infusion and Trypticase-Soy and phosphate ion in human urine. These interfering phenomena are substantially overcome by the inclusion of glucose-6-phosphate in the sensitivity disc.

75

Example 8

80

Effect of Glucose-6-Phosphate on the Sensitivity of *Escherichia Coli* Strains to Several Phosphonomycin Analogues

85

Overnight cultures of *Escherichia coli*, strains MB 2489 (possessing both the α-glycerophosphate transport and the glucose-6-phosphate transport systems) and MB 2498 (possessing only the glucose-6-phosphate pathway, and therefore relatively resistant to

- phosphonomycin alone) were diluted one hundred fold and a 0.05-ml portion was swabbed over the surface of a 2 mm of Nutrient Broth, 1.5% agar (Difco). Sensitivity discs consisting of a 7-mm-diameter paper disc containing disodium phosphonomycin or one of the indicated analogues in the stated quantities together with an additional 5 μ g of disodium glucose-6-phosphate where indicated, were placed on the surface of the seeded agar. Zones of inhibition were measured after 18 hours of incubation at 37°C.

Active substance	Amount μ g	MB 2489		MB 2498	
		no G—6—P	+ G— 6—P	no G—6—P	+ G— 6—P
Phosphonomycin	5	14	28	0	30
	2.5	12	25	0	24
	1.0	0	20	0	24
	0.3	0	18	0	15
1-methyl-1,2 epoxyethyl phosphonic acid, mono dicyclohexyl amine salts	500	20	38	9	42
	50	0	32	0	36
	5	0	13	0	16
1,2 epoxyethyl phosphonic acid, dicyclohexyl ammonium salt	500	16	35	8	38
	50	0	26	0	29
	5	0	10	0	12

- Glucose-6-phosphate is observed to so potentiate the sensitivity of phosphonomycin-sensitive and resistant strains that they now respond to weak analogues of phosphonomycin to the same degree as to phosphonomycin by itself.
- Example 9
Effect of Phosphonomycin and Glucose-6-Phosphate and Combinations thereof in Treatment of Infected Mice
- Female C.D.1 mice of average weight, 22.5 g., were infected intraperitoneally with 16-hour broth cultures appropriately diluted in brain heart infusion. For *E. coli* the challenge contained 2.5×10^7 cells or 7 LD₅₀ doses; for *Shigella*, 2.3×10^8 cells or 3 LD₅₀ doses. At the time of infection the disodium salt of phosphonomycin and sodium glucose-6-phosphate was administered separately in 0.25 ml. subcutaneously at a separate site, one on each side of the dorsal surface. The results of these tests are shown in the following table:

Test Organism	ED ₅₀ subcutaneously						
	G—6—P μ g	Disodium phosphonomycin (DSP)		DSP + 1.0 mg G—6—P		DSP + 0.1 mg G—6—P	
		μ g	%	μ g	%	μ g	%
<i>Escherichia coli</i> 2017	>4000	155	100	12	8	91	58
<i>Shigella</i> (118—57) 3303	>4000	1000	100	82	8	1500	150

- Example 10
Effect of Phosphonomycin and Glucose-6-Phosphate, and Combinations thereof in the Treatment of Infected Mice
- In further mouse tests carried out as described in Example I except that the antibiotic was combined with the sodium glucose-6-phosphate and given in one injection, the following results were obtained in mice infected with *Aerobacter aerogenes* and *Staphylococcus aureus*:

Test Organism	Disodium phosphonomycin (DSP) s.c. ED ₅₀ in µg					
	DSP Alone	µg G—6—P added to DSP				G—6—P ED ₅₀ used alone (µg)
		4000	1000	500	100	
<i>Aerobacter aerogenes</i> 3148	10,000+	287	3,000	7,700	10,000	>4,000
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith 2949	96	22	50			>4,000

Example 11

Effect of Fructose-6-Phosphate in Potentiating Phosphonomycin in Mice

5 The efficacy of fructose-6-phosphate in potentiating the control by phosphonomycin of experimental bacterial infections in mice was compared with that of glucose-6-phosphate in

tests following the protocol of Example 10. Again the antibiotic was combined with the sugar phosphate in a single subcutaneous injection administered at the time of intraperitoneal inoculation with *Escherichia coli*, MB 2017.

10

Potentiator	Dose (µg)	ED ₅₀ µg Phosphonomycin
None	—	2000
Glucose-6-phosphate disodium	1000	17
	600	31
	300	69
	100	470
Fructose-6-phosphate disodium	1000	17
	600	57
	300	202
	100	534

Fructose-6-phosphate is seen to exercise a degree of potentiation toward phosphonomycin that is comparable with that observed previously in the parallel experiment with glucose-6-phosphate. This equivalency was expected both from the similar enhancement of inhibition observed *in vitro*, in Example 5, when either of these sugar phosphates were combined with phosphonomycin, and from the certainty of their interconversion by the ample phosphoglucoseisomerase activity present in plasma.

20

25

Example 12

Therapeutic Efficacy of Phosphonomycin Administered Orally to Infected Mice Receiving Glucose-6-Phosphate by Either the Oral or Subcutaneous Route

30

The protocol of Example 9 was followed for the case of *Escherichia coli* 2017 except that immediately upon infection the disodium salt of phosphonomycin was administered orally, while disodium glucose-6-phosphate, where indicated, was administered either orally or by the subcutaneous route. In no case was protection observed when glucose-6-phosphate was administered alone at the 4000 µg level, orally or subcutaneously, in the absence of phosphonomycin.

35

40

Glucose-6-phosphate µg	Route	Dose of phosphonomycin (µg) administered orally that protects 50% of animals (ED ₅₀)
0	—	2000
1000	orally	2000
100	subcutaneous	37

Glucose-6-phosphate is an effective potentiator of therapy for phosphonomycin administered orally (25 fold sensitization) when sugar phosphate is administered subcutaneously. No sensitization is observed when the sugar phosphate is administered orally at that level.

Example 13

Therapeutic Efficacy of Phosphonomycin Administered Parenterally to Infected Mice Receiving Glucose-6-Phosphate Salts Orally
The protocol of Example 9 was followed for the case of *Escherichia coli* 2017 except that immediately after infection the disodium salt of phosphonomycin was administered subcutaneously, while glucose - 6 - phosphate in the indicated form was administered orally by

gavage in 0.25 ml. of water. In no case was protection observed with the glucose - 6 - phosphate salts administered alone, nor did the oral administration solely of 2.5 mg. of *n*-octylammonium chloride (without glucose - 6-phosphate) decrease the ED₅₀ of phosphonomycin coadministered parenterally. The *n*-octyl - ammonium salts of glucose - 6 - phosphate were prepared by converting its disodium salt to the free acid by passage through a column containing a 20-fold excess of Dowex-50 (H⁺ form), followed by neutralisation of portions of the eluate with either 0.7, 1.5, or 2.0 molar equivalents of the free *n*-octylamine base, and 1.3, 0.5, or 0 molar equivalents of NaOH respectively, to give a final pH of 7.5 in each case.

Glucose-6-phosphate salt (mg)		Dose of phosphonomycin that protects 50% of animals (ED ₅₀) (μg)	
TEST I			
none			500
disodium salt	[100	27
		50	63
		25	125
		12.5	302
		6.25	531
sodium 0.5 ÷ <i>n</i> -octyl- ammonium 1.5	[10	66
		1	302
TEST II			
none			827
di- <i>n</i> -octyl- ammonium	[5	125
sodium 0.5 <i>n</i> -octyl- ammonium 1.5	[5	168
sodium 1.3 <i>n</i> -octyl- ammonium 0.7	[5	714

- Glucose - 6 - phosphate administered orally potentiates therapy by phosphonomycin, and is rendered more efficient in this effect in proportion to the fraction of inorganic counterion replaced by lipophilic amine. 15
- 5
- Example 14
Potentiation by Coadministered Galactose-6-phosphate of Phosphonomycin Therapy in Mice Infected with *Staphylococci* 20
- 10 An examination of the efficacy of galactose-6 - phosphate in potentiating the control by phosphonomycin of experimental *Staphylococcal* infections in mice was justified by the finding, made in an application to this strain of the methodology described in Example 6, that 25 μ g of this sugar phosphate when added to a sensitivity disc bearing 5 μ g of phosphonomycin produced a 21 mm zone of inhibition as opposed to a 17 mm zone for the unsupplemented disc, when the discs were placed on a Nutrient Agar plate seeded with *Staphylococcus aureus* Smith 2949. In the therapy trial below, the antibiotic was combined with the sugar phosphate in a single subcutaneous injection administered at the time of intraperitoneal injection with 10^6 cells per mouse (14 LD₅₀'s), with cells grown for 16 hours in brain-heart infusion. 25

Potentiator	Dose (μ g)	ED ₅₀ (μ g Phosphonomycin)
none	—	212
disodium glucose-6-phosphate	4000	91
disodium galactose-6-phosphate	4000	25

- 30 The effectiveness of galactose - 6 - phosphate as a potentiator is explained by the demonstrated existence in *Staphylococcus* of an inducible galactose - 6 - phosphate transport system. Galactose - 6 - phosphate is a metabolite of lactose hydrolysis unique to certain Gram-positive organisms, not however generated or utilized by *E. coli*. This accounts for the failure of galactose - 6 - phosphate to potentiate phosphonomycin action on *E. coli* (Example 5). 35
- Example 15
Effect of Mannose-6-phosphate in Potentiating Phosphonomycin in Mice 45
- The efficacy of mannose - 6 - phosphate in potentiating the control by phosphonomycin of experimental infections in mice was compared with that of glucose - 6 - phosphate, in tests following the protocol of Example 10. Again the antibiotic was titrated in combination with a series of fixed levels of sugar phosphates in a single subcutaneous injection administered at the time of intraperitoneal inoculation with *Escherichia coli* MB 2017. 50

Potentiator	Dose (μ g)	ED ₅₀ (μ g Phosphonomycin)
none	—	1420
disodium glucose-6-phosphate	1000	18
disodium mannose-6-phosphate	1000	19
„	500	23
„	250	92
„	125	490

5

10

Mannose - 6 - phosphate exercises a degree of potentiation toward phosphonomycin equivalent to that of comparable levels of glucose - 6 - phosphate, even though its effect *in vitro* is only one-tenth that of glucose - 6 - phosphate. This discrepancy can be attributed to the conversion of mannose - 6 - phosphate to glucose - 6 - phosphate *in vivo* by sequential action of mannose - phosphate - isomerase and phosphoglucose isomerase, enzymes whose activities are demonstrable in plasma and in the walls of blood vessels.

Example 16
Potentiation by Glucose - 1 - phosphate and Ribose - 5 - phosphate of Phosphonomycin Therapy in Mice
The efficacy of glucose - 1 - phosphate and ribose - 5 - phosphate in potentiating the control by phosphonomycin of experimental bacterial infections in mice was compared with that of glucose - 6 - phosphate in tests following the protocol of Example 10. Again the antibiotic was titrated for its curative efficacy in combination with the indicated fixed levels of sugar phosphate in a single injection administered at the time of intraperitoneal inoculation with *E. coli* MB 2017.

15

20

25

Potentiator	Dose (μg)	ED ₅₀ (μg Phosphonomycin)
none	—	940
disodium glucose-6-phosphate	1000	5
dipotassium glucose-1-phosphate	1000	9
disodium ribose-5-phosphate*	1000	158

* This sample was demonstrated by a specific assay with glucose-6-phosphate dehydrogenase to be contaminated by no more than one part per thousand of glucose-6 phosphate.

30

35

40

45

The potentiating ability of 1000 μg of ribose - 5 - phosphate, while significant, is equivalent only to that produced by approximately 100 μg of glucose - 6 - phosphate (see Example 11). This degree of relative potency was anticipated from the ratio of the weights of ribose - 5 - phosphate to glucose - 6 - phosphate which produce equivalently enhanced zones of inhibition *in vitro* (Example 5). The equivalent potencies of glucose - 1 - phosphate and glucose - 6 - phosphate *in vivo*, despite differences *in vitro*, is most likely attributable to rapid conversion of the 1 - phosphate to the 6-phosphate by the action of phosphoglucomutase, known to be present in plasma.

Example 17
Potentiation by Coadministered Lactose of Phosphonomycin Therapy in Mice Infected with Streptococci
On applying the methodology described in

Example 6 to the *Streptococci*, it was found that 250 μg of lactose added to a sensitivity disc bearing 30 μg of phosphonomycin produced a 27 mm diameter zone of inhibition, as compared with a 12 mm zone with an unsupplemented disc, when the discs were placed on a Nutrient Agar plate seeded with *Streptococcus faecalis* R. In the therapy trials below, 14 colony - forming units (7 LD₅₀'s) of the pathogenic *Streptococcus pyogenes* (1934) grown in brain-heart broth supplemented with 10% horse serum, were inoculated intraperitoneally. Simultaneously, 0.5 ml of either a lactose solution or a saline control were injected subcutaneously followed in Trial I by a single 0.5 ml dose of phosphonomycin orally (by gavage), and in Trial II by 4 successive 0.5 ml oral doses of antibiotic at 0, 2, 4, and 6 hours post infection.

50

55

60

65

Potentiator	Dose (mg)	ED ₅₀ (total phosphonomycin administered — µg)
TRIAL I		
none	—	3,950
lactose	4	1,530
TRIAL II		
none	—	2,100
lactose	4	800

Neutral saccharides are thus capable of potentiating phosphonomycin action *in vivo* as *in vitro*. Certain *Streptococci*, in common with *Staphylococci*, also show inducible metabolism of lactose to galactose - 6 - phosphate. The following experiments, though not part of the invention give further background information concerning transport systems in bacteria.

Experiment 1

Efficacy of Phosphonomycin in Protecting Mice Infected by Mutant Bacterial Isolates Displaying High Levels of the L - α - Glycerophosphate Transport System In the Absence of Inducer

Mutants were isolated from *E. coli* 2017 using a mutagenesis and mutant detection screen described in *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 60, p. 422—424, 1962, and these mutants showed high levels of α-glycerophosphate and glycerol metabolism without the need for prior growth in the presence of these inducers, such as is shown by the

natural strains. The diameter of the zones of inhibition around sensitivity discs bearing 5 µg of phosphonomycin, placed on Nutrient Agar plates seeded with mutants C₁, C₂, and the parent strain, were 20, 24, and 12 mm respectively. Since we have shown (Example I), that the addition of glycerol to such discs on the parent strain increases the zone size to 26—29 mm, we conclude that the mutant strains possess levels of the phosphonomycin transport system (i.e., the L - α - Glycerophosphate transport system) comparable to those of induced wild type strains. Therefore, the response of these mutants to phosphonomycin therapy should be predictive of the response of induced wild type strains in other situations. Mutants C₁ and C₂ and the parent strain were grown under identical conditions (described in Example 9) and were inoculated intraperitoneally into mice at the indicated challenge levels. Mice were injected subcutaneously with phosphonomycin immediately following infection.

Bacterial Strain	No. of Cells Inoculated (virulence)	ED ₅₀ (µg phosphonomycin)
<i>E. coli</i> 2017 (parent strain)	4.2×10^6 (10 LD ₅₀ 's)	943
Mutant C ₁	4.7×10^6 (30 LD ₅₀ 's)	12
Mutant C ₂	1.2×10^7 (9 LD ₅₀ 's)	14

Thus, even though these mutants possess full virulence, they are controlled by remarkably low levels of phosphonomycin, implying

that the uninduced wild-type strain displays *in vivo* far less than its full inducible capacity for responding to phosphonomycin.

- Experiment 2
Effect of Coadministered Glucose - 6 - Phosphate on the Susceptibility to Phosphonomycin, *In Vitro* and *In Vivo* of a Bacterial Variant That Had Acquired Resistance to Phosphonomycin During Therapy in Man.
- 5 The strains of *Escherichia coli* used below represent, in the case of M 13, an isolate from the urine of an infected female just prior to her treatment with phosphonomycin, and in the case of M 21, an isolate of the drug-resistant organisms present in the urine of this individual after therapy for 7 days with the antibiotic. The *in vitro* susceptibility tests were performed in the manner described in Example 6. The *in vivo* mouse protection trial was carried out as described in Example 9 following intraperitoneal challenge with the indicated number of organisms.
- 10

IN VITRO SUSCEPTIBILITY TESTS

	Zones of inhibition (mm) surrounding discs bearing 30 µg of phosphonomycin alone, or in combination with 5 µg of glucose-6-phosphate	
	Phosphonomycin alone	plus glucose -6-phosphate
<i>E. coli</i> M 13	19	28
<i>E. coli</i> M 21	0 (less than 7 mm)	20

CURATIVE EFFICACY OF PHOSPHONOMYCIN IN INFECTED MICE

	(Ed ₅₀ 's in mg)	
	Phosphonomycin above	Phosphonomycin co-administered with 1 mg glucose-6-phosphate, disodium
<i>E. coli</i> M 13		
3.7 × 10 ⁷ cells	0.25	0.035
= 8 LD ₅₀ 's		
<i>E. coli</i> M 21		
1.2 × 10 ⁷ cells	17.5*	2.5
= 10 LD ₅₀ 's		

* At the highest drug level administered to this group, 20 mg per mouse, only 3 of the 5 infected animals were protected. In the other three groups complete protection was observed at no higher than twice the median level quoted.

- Since the resistant strain retained the ability to respond to phosphonomycin upon co-addition of glucose - 6 - phosphate, it may be inferred that the hexose - 6 - phosphate transport pathway is not significantly induced by endogenous substances in the natural urinary infections of man. When transport is evoked by the intentional coadministration of inducers, resistance to phosphonomycin should be prevented or overcome, and the therapeutic elimination of such strains should be made possible.
- 25
- 30

- Experiment 3
Effect of Coadministered Glucose - 6 - Phosphate on the Susceptibility to Phosphonomycin, *In Vitro* and *In Vivo*, of a Wild-Type, Inducible Bacterial Strain and A Non-Inducible Mutant Derived Therefrom.
- 5 A mutant designated 2017 A showing no additional response *in vitro* to phosphonomycin upon addition of glucose - 6 - phosphate
- 10 was isolated from its parent, the naturally occurring pathogen *Escherichia coli* 2017 by the procedure described in Example 6 for the isolation of Strain MB 2489 A2 from its parent MB 2489. Mutant 2017 A showed a normal ability to metabolise glucose - 6 - phosphate. Its *in vitro* susceptibility to phosphonomycin, *in vivo*, relative to the parent strain, was determined twice in mouse protection trials described below, by the protocol established in Example 9.

IN VITRO SUSCEPTIBILITY TESTS

Zones of inhibition (mm) surrounding discs bearing 30 µg of phosphonomycin alone, or in combination with 5 µg of glucose-6-phosphate, disodium.

	Phosphonomycin alone	plus glucose -6-phosphate
<i>E. coli</i> 2017	18	27
<i>E. coli</i> 2017 A	17.5	18

CURATIVE EFFICACY OF PHOSPHONOMYCIN IN INFECTED MICE

(ED₅₀'s in mg)

	Phosphonomycin alone	Phosphonomycin co-administered with 1 mg glucose-6-phosphate, disodium
TRIAL I		
<i>E. coli</i> 2017		
1 × 10 ⁶ cells	0.230	0.015
= 9 LD ₅₀ 's		
<i>E. coli</i> 2017 A		
1 × 10 ⁶ cells	0.166	0.284
= 7 LD ₅₀ 's		
TRIAL II		
<i>E. coli</i> 2017		
5 × 10 ⁶ cells	0.821	0.021
= 13 LD ₅₀ 's		
<i>E. coli</i> 2017 A		
9 × 10 ⁶ cells	1.420	1.130
= 33 LD ₅₀ 's		

The indifference of mutant 2017 A to the combination of glucose - 6 - phosphate with phosphonomycin *in vitro*, is reflected perfectly *in vivo* by the failure of co-administered glucose - 6 - phosphate to enhance the efficacy of phosphonomycin in treatment of mice infected by this mutant. Thus the normal potentiation by glucose - 6 - phosphate of phosphonomycin's curative effect must be attributed to its direct action on inducible infecting strains of bacteria and not by any host response that might be conjectured (such as enhanced drug absorption or immune response) which would have affected the mutant as favorably as the parent strain. The similar efficacy of phosphonomycin alone, against infections due to inducible and non-inducible organisms, implies that endogeneous inducers are either absent from or at too low a level (in those areas of the body invaded by microorganisms) to evoke the biosynthesis of the hexose - 6 - phosphate transport system. Thus the manifest potential benefits resulting from induction of this system, require explicit administration of exogeneous inducer by the therapist.

WHAT WE CLAIM IS:—

1. A method of potentiating the antibacterial activity of a phosphonomycin antibiotic in a non-human animal, that comprises bringing bacteria into contact with an inducer selected from phosphatides, sugar phosphates and salts thereof, and polyhydric alcohols, whereby an existing phosphonomycin transport pathway in the bacteria is enhanced or a new pathway is brought into being, and subsequently or simultaneously bringing the bacteria into contact with a phosphonomycin antibiotic.

2. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is glucose - 6 - phosphate.

3. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is mannose - 6 - phosphate.

4. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is glucose - 1 - phosphate.

5. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is ribose - 5 - phosphate.

6. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is galactose - 6 - phosphate.

7. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is lactose.

8. A method as claimed in claim 1 in which the inducer is glycerol, DL - α - glycerophosphate, glucose - 6 - phosphate disodium or dipotassium, fructose - 6 - phosphate disodium, mannose - 6 - phosphate disodium, 2 - deoxyglucose - 6 - phosphate disodium, 2 - amino-2 - deoxy - glucose - 6 - phosphate disodium, ribose - 5 - phosphate disodium, phosphatidyl ethanolamine, glucose - 1',6' - diphosphate tetrapotassium pentahydrate, glucose - 1 - phosphate disodium, 5 - phosphoryl - ribose - 1 - pyrophosphate dimagnesium dihydrate, riboflavin - 5 - phosphate disodium, galactose - 6 - phosphate disodium or a glucose - 6 - phosphate *n* - octylammonium salt.

9. A method as claimed in any one of claims 1—8 in which the phosphonomycin antibiotic is a salt of phosphonomycin.

10. A method as claimed in any one of claims 1—9 in which the inducer and the antibiotic are administered parenterally in a single composition.

11. A method as claimed in any one of claims 1—9 in which the inducer is administered parenterally and the phosphonomycin antibiotic orally.

12. An antibiotic composition comprising a phosphonomycin antibiotic as herein defined an inducer of a phosphonomycin transport system in bacteria, selected from phosphatides, sugar phosphates and salts thereof, and polyhydric alcohols, and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or vehicle.

13. A composition as claimed in claim 12, in the form of tablets, powders, granules, capsules, suspensions, solutions, elixirs, syrups or sterilized solutions or suspensions for parenteral administration.

14. A composition as claimed in claim 12, in topically administrable form.

15. A method as claimed in claim 1, substantially as hereinbefore described in any one of Examples 1—17.

For the Applicants
D YOUNG & CO
Chartered Patent Agents
9 and 10 Staple Inn
London WC1V 7RD